Journal of Horticultural Science
Vol. 35, No.3, Fall 2021, P. 427-446
ISSN: 2008 - 4730

نشریه علوم باغبانی (علوم و صنایع کشاورزی)
جلد ۳۵، شماره ۳، پاییز ۱۴۰۰، ص. ۴۴۶-۴۲۷
شاپا: ۴۷۳۰ - ۲۰۰۸

مقاله پژوهشی

تأثیر مرحله بلوغ میوه بر ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی و پلی‌فنل‌های میوه اترج صغیر (*Citrus medica* var. medica Proper.)

نحله تقوایی فرد[1]- عسکر غنی[2]*- مهدی حسینی فرهی[3و4]

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۰۶/۱۵
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۰۹/۱۷

چکیده

به منظور بررسی تأثیر مرحله بلوغ میوه بر ویژگی‌های بیوشیمیایی بخش‌های مختلف میوه اترج صغیر، آزمایشی به صورت فاکتوریل بر پایه طرح بلوک‌های کامل تصادفی با دو فاکتور و چهار تکرار اجرا گردید. فاکتور اول، دارای چهار سطح شامل مراحل مختلف بلوغ میوه (سبزرسیده، تغییررنگ پوست، زردرسیده و بسیاررسیده) بود. فاکتور دوم دارای چهار سطح شامل بخش‌های مختلف میوه اترج صغیر (فلاودو، آلبیدو، تفاله و آب‌میوه) بود. مهمترین صفات اندازه‌گیری شده شامل میزان فلاون و فلاونول، فلاونوئید کل، ترکیبات فنلی کل و فعالیت آنتی‌اکسیدانی بود. تغییرات فیزیکی بخش‌های مختلف میوه و همچنین ویژگی‌های مربوط به آب‌میوه (اسیدیته، مواد جامد محلول، اسیدیته قابل‌تیتر و ویتامین ث) در طی بلوغ میوه اندازه‌گیری شد. مهمترین ترکیبات فیتوشیمیایی بخش فلاودو شامل درصد و عملکرد اسانس، محتوی کلروفیل و پلی‌فنل‌ها (روتین، ترانس-فرولیک اسید، هسپریدین، هسپرتین و کوئرستین) در طی رسیدن میوه بررسی شد. نتایج نشان‌دهنده تاثیر معنی‌دار مرحله بلوغ میوه بر بیشتر صفات مورد بررسی بود. بیشترین میزان فلاون و فلاونول (۰/۳۷۷ میلی‌گرم برگرم) و فلاونوئید کل (۱۶/۳۸ میلی‌گرم برگرم) مربوط به فلاودو در مرحله بسیار رسیده بود. بالاترین میزان اسانس فلاودو (۲/۳۷ درصد حجمی-وزنی) در مرحله تغییر رنگ اندازه‌گیری شد و با پیشرف بلوغ محتوی کلروفیل دستخوش تغییرات نزولی گردید. پیشرفت بلوغ باعث کاهش بیشتر اجزای پلی‌فنل‌های اندازه‌گیری شده شامل هسپریدین (۱/۸۶ به ۰/۶۸ میلی‌گرم برگرم)، کوئرستین (۱/۶۲ به ۰/۸۹ میلی‌گرم برگرم) و روتین (۰/۴۲ به ۰/۱۷ میلی‌گرم برگرم) گردید. به طور کلی بخش فلاودو به عنوان مهم‌ترین بخش دارویی میوه اترج و مراحل ابتدایی بلوغ زمان مناسب‌تری برای برداشت تعیین گردید.

واژه‌های کلیدی: اترج صغیر، اسانس، فلاودو، فعالیت آنتی‌اکسیدانی، هسپریدین

مقدمه

نوعی از بالنگ را به فارسی بادرنگ می‌نامند و در کتب طب سنتی با نام‌های بادرنج و اترج صغیر آمده است. نام علمی آن *Citrus medica* L. و مترادف آن را *Citrus medica* var. medica Proper. نیز می‌نامند (۲۴). میوه‌های مرکبات دارای ترکیبات ارزشمندی شامل ترکیبات ترپنی (اسانس‌ها)، اسید سیتریک، فلاونوئیدها، فنل‌ها، مواد پکتینی، لیمونوئیدها، ویتامین ث و غیره می‌باشند (۲۱). ترکیبات فنلی میوه مرکبات شامل فلاونوئیدها و اسیدهای فنلی است و فلاونوئیدهای گلیکوزیدی در مرکبات غالبیت دارند. فلاوونوئیدها، متابولیت‌های ثانویه‌ای هستند که به طور طبیعی در گیاهان وجود دارند و خواص بیولوژیکی قابل توجهی دارند. از پوست مرکبات به دلیل داشتن مقادیر چشمگیری از فلاونوئیدها، در صنایع غذایی و دارویی استفاده می‌شود. همچنین این ترکیبات باعث حفاظت بدن در مقابل بیماری‌هایی مانند سرطان و عارضه‌های قلبی و عروقی می‌شوند (۳۲). فلاونوئیدهای موجود در بخش‌های مختلف مرکبات دارای خواص آنتی‌اکسیدانی قوی می‌باشند و رادیکال‌های آزاد را مهار کرده و خطر برخی بیماری‌های مزمن را کاهش می‌دهند و همچنین از برخی اختلالات قلبی-عروقی جلوگیری می‌کنند (۳۲). پوست واریته‌های بالنگ دارای سیتروفلاونوئیدها است که متشکل از مخلوطی از هسپریدوساید،

۱ و ۳- به‌ترتیب دانشجوی دکتری و دانشیار، گروه علوم باغبانی، واحد یاسوج، دانشگاه آزاد اسلامی، یاسوج، ایران
۲- استادیار، گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه جهرم، جهرم، ایران
(*- نویسنده مسئول: Email: askar.ghani11@yahoo.com)
۴- گروه پژوهشی کشاورزی پایدار و امنیت غذایی، واحد یاسوج، دانشگاه آزاد اسلامی، یاسوج، ایران

DOI: 10.22067/jhs.2020.61947.0

نارینگوساید و فلاونون‌ها[1] می‌باشد که طبق تحقیقات انجام شده دارای خاصیت ضد میکروبی می‌باشند (۲). مرحله نمو بخش دارویی هر گیاه، یکی از مهم‌ترین عوامل تاثیرگذار بر کمیت و کیفیت مواد موثره گیاهان دارویی می‌باشد و تغییرات این متابولیت‌ها در طی بلوغ یا مراحل فنولوژی رشد گیاهان توسط محققین مورد بررسی قرار گرفته است. در یک پژوهش مشخص گردید که مهم‌ترین ترکیبات بخش پوست میوه بالنگ واریته کورسیکان (Corsican) در طی بلوغ میوه شامل روتین، دیوسمین و نئوهسپریدین[2] بودند و در زمان رسیدن، ترکیبات فلاونوئیدی به شکل متفاوتی تغییر یافت. روتین و هسپریدین مهم‌ترین ترکیبات موجود در عصاره اترج نیز می‌باشد. طبق تحقیقات انجام شده، بالنگ تنها گونه مرکباتی است که مقدار این ترکیبات را در سطح بالایی دارد (۳۴). در پژوهشی دیگر، برای اولین‌بار برخی ترکیب‌های شیمیایی و ویژگی آنتی‌اکسیدانی گل‌ها، برگ‌ها و میوه بالنگ (*Citrus medica* L. cv. Diamante) در دو مرحله بلوغ مورد بررسی قرار گرفت. در این پژوهش، بیشترین میزان فلاونوئید و فنول کل در گل‌ها و برگ‌ها یافت شد و در طول رسیدن میوه، این ترکیبات روند کاهشی نشان دادند. همچنین فعالیت آنتی‌اکسیدانی در گل‌ها و بخش درون‌بر میوه (Endocarp) بیشتر از سایر بخش‌ها بود (۲۳). در یک مطالعه مشخص شد که همزمان با بلوغ میوه‌های پونکان[3] (*Citrus poonensis* Hort. ex Tanaka) و نوعی گریپ‌فروت (هویو Huyou) اسیدهای فنلی موجود در پوست و گوشت میوه کاهش یافت، ولی در نهایت میزان آنها در پوست بیشتر از گوشت بوده است (۳۹). در تحقیق دیگری که بر روی میزان ترکیبات فلاونوئیدی، فنول کل و ویتامین ث سه رقم یوزو Yuzu (Citrus junos ex Tanala) شامل ارقام واندو، گوهونگ و سادونگ (Wando, Goheung and Sadeung) و در سه زمان (نارس، نیمه‌رسیده و رسیده بالغ) انجام شد، نتایج نشان داد میزان ترکیبات فلاونوئید، فنول کل و ویتامین ث در هر سه رقم در بخش پوست بیشتر از گوشت می‌باشد (۴۰).

اترج صغیر یکی از گونه‌های مهم مرکبات می‌باشد که در مقایسه با سایر مرکبات سطح زیر کشت کمتری دارد و آمار دقیقی در رابطه با میزان کشت آن موجود نمی‌باشد ولی به عنوان یکی از محصولات بومی و محلی در شهرهای جنوبی استان فارس می‌باشد. همچنین علاوه بر استفاده از آب میوه، از سایر بخش‌های میوه به ویژه فلاودو به منظور اهداف دارویی و صنایع غذایی استفاده می‌گردد (۲۱ و ۳۲). در این تحقیق برای اولین بار برخی تغییرات فیزیکی و بیوشیمیایی بخش‌های مختلف میوه اترج صغیر در طی بلوغ میوه مورد بررسی قرار گرفت. همچنین برخی از مواد موثره (میزان اسانس، اجزای فلاونوئیدها و ....) فلاودو به عنوان مهمترین بخش دارویی میوه در طی مراحل مختلف رسیدن میوه اندازه‌گیری شد.

مواد و روش‌ها

برای انجام این تحقیق، آزمایشی به صورت فاکتوریل بر پایه طرح بلوک‌های کامل تصادفی با دو فاکتور و چهار تکرار انجام شد. فاکتور اول، دارای چهار سطح شامل مراحل مختلف بلوغ میوه: رسیده سبز، مرحله تغییر رنگ پوست (Intermediate)، مرحله رسیده زرد و بسیار رسیده (Over-rip) بود (شکل شماره ۱). فاکتور دوم دارای چهار سطح شامل بخش‌های مختلف میوه اترج صغیر شامل پوست بیرونی یا فلاودو (Flavedo)، بخش داخلی پوست یا سپیدبر (Albedo)، تفاله و آب‌میوه بود. مهمترین صفات اندازه‌گیری شده در این آزمایش شامل میزان فلاون و فلاونول، فلاونوئید کل، میزان ترکیبات فنلی و درصد فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره بخش‌های مختلف میوه بود. در بخش دوم آزمایش، ویژگی‌های کمی و کیفی مربوط به آب‌میوه شامل حجم آب‌میوه، میزان اسیدیته (pH)، میزان مواد جامد محلول (TSS)، اسیدیته قابل تیتر (TA)، نسبت TSS/TA و ویتامین ث در مراحل مختلف بلوغ اندازه‌گیری شد. تغییرات درصد اسانس، عملکرد اسانس، محتوی کلروفیل و اجزای پلی‌فنل‌های فلاودو (روتین، ترانس فرولیک اسید، هسپریدین، هسپرتین و کوئرستین[4]) در طی بلوغ میوه مورد بررسی قرار گرفت. همچنین تغییرات فیزیکی بخش‌های مختلف میوه (وزن تر و خشک فلاودو و آلبیدو، قطر میوه، طول میوه، نسبت وزن تر و خشک فلاودو به آلبیدو و وزن تر میوه) در طی رسیدن میوه اندازه‌گیری شد. در ادامه به روش اندازه‌گیری برخی صفات اشاره می‌شود.

انتخاب باغ و زمان‌های برداشت

میوه‌های اترج صغیر در مراحل مختلف بلوغ از باغ مرکبات واقع در شهرستان جهرم-منطقه حسین‌آباد قبله با مختصات جغرافیایی ۵۳ درجه و ۳۰ دقیقه طول جغرافیایی و ۲۸ درجه و ۲۶ دقیقه عرض جغرافیایی و ارتفاع از سطح دریا ۱۱۷۲/۹ متر در سال زراعی ۱۳۹۷-۱۳۹۶ برداشت شدند. ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی خاک باغ مورد استفاده در جدول ۱ گزارش شده است. عمر درختان ۵ ساله (پیوند شده بر روی پایه لیموی محلی)، آبیاری در ماه‌های شهریور و مهرماه یک روز در میان به مدت ۲ ساعت و از آبان تا اسفند به مدت ۱/۵ ساعت، یک روز در میان انجام شد. زمان‌های برداشت در مراحل مختلف رسیدن (برداشت‌ها به ترتیب هفتم مهر، ۲۸ آبان، اول دیماه و

1- Hesperidoside naringoside and flavanones
2- Rutin, diosmin and neohesperidin
3- Ponkan

4 - Trans-ferulic acid, hesperidin, hesperetin and quercetin

۲۹ بهمن) به ترتیب مصادف با ۱۸۳ روز پس از گلدهی (مرحله سبز رسیده)، ۲۳۴ روز پس از گلدهی (مرحله تغییر رنگ)، ۲۶۷ روز پس از گلدهی (میوه زرد رسیده) و ۳۲۵ روز پس از گلدهی (بسیار رسیده) بود.

برداشت میوه‌ها و خشک کردن

برداشت میوه در زمان‌های مختلف در چهار جهت درخت (شمال، جنوب، شرق و غرب) در سه ارتفاع مختلف (صفر تا ۷۰، ۷۰ تا ۱۴۰ و ۱۴۰ تا ۲۱۰ سانتی‌متر) به تعداد ۱۵ عدد میوه انجام و نمونه‌ها کاملاً با هم مخلوط شدند. بعد از انتقال به آزمایشگاه، میوه‌ها به صورت کامل با آب شسته شده و پوست نازک رویی (فلاودو) جداگانه به روش دستی با استفاده از چاقوی تیز جدا شد. بخش‌های مختلف میوه به قطعات کوچک (۲ تا ۳ سانتی‌متر) تقسیم شدند و به مدت ۷ روز در سایه، در دمای اتاق (۲±۳۰ درجه سانتی‌گراد) خشک شدند (شکل شماره ۱). پس از خشک شدن بخش‌های مختلف میوه، هرکدام جداگانه بسته‌بندی و جهت پیشگیری از تغییرات تحت تأثیر محیط، در یخچال (دمای ۴ درجه سانتی‌گراد) نگهداری شدند. آزمایشات مربوطه در آزمایشگاه گیاهان دارویی دانشگاه جهرم انجام گردید.

تعیین برخی صفات بیوشیمیایی

عصاره‌گیری جهت محاسبه ویژگی‌های بیوشیمیایی بخش‌های مختلف میوه در مراحل بلوغ، توسط متانول (۷۰ درصد) با نسبت ۵ به ۱ (حجمی-وزنی، متانول و نمونه خشک گیاهی) به روش خیساندن در حلال (Maceration) انجام شد (۳۷). میزان فلاون و فلاونول به روش پوپووا و همکاران با تغییرات جزئی اندازه‌گیری شد و نتایج به‌صورت میلی‌گرم اکی‌والانت کوئرستین در گرم وزن خشک بیان شده است (۲۸). اندازه‌گیری میزان فلاونوئید کل به روش منی‌چینی و همکاران با استفاده از معرف کلریدآلومینیوم انجام شد. جهت محاسبه میزان این ترکیب از کوئرستین به عنوان استاندارد استفاده شد (۲۲). میزان ترکیبات فنلی کل بر اساس معرف فولین سیوکالتئو (Folin-ciocalteu) در طول موج ۷۶۵ نانومتر اندازه‌گیری شد. غلظت‌های مختلف گالیک اسید به عنوان استاندارد مورد استفاده قرار گرفت و داده‌ها به صورت میلی‌گرم گالیک اسید در گرم وزن خشک بیان شد (۳۷). اندازه‌گیری فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌ها بر اساس آزمون دی‌پی‌پی‌اچ (DPPH) با اضافه کردن ۵۰۰ میکرولیتر از عصاره به ۵ میلی‌لیتر محلول دی‌پی‌پی‌اچ (۰/۰۰۴ درصد) انجام شد (۲۶).

اندازه‌گیری محتوی کلروفیل و ویژگی‌های آب میوه

اندازه‌گیری محتوی کلروفیل بر اساس روش در و همکاران (۸) با استفاده از حلال متانول و قرائت میزان جذب در طول موج‌های ۴۷۰، ۶۵۳ و ۶۶۶ نانومتر انجام شد. اسیدیته آب میوه با استفاده از دستگاه pH متر آزمایشگاهی (مدل AZ86P3) انجام شد. در برداشت‌های مختلف در هر تکرار چهار قرائت انجام شد. جهت اندازه‌گیری مواد جامد محلول، در هر مرحله از برداشت، میزان یک قطره از آبمیوه (صاف شده و بدون ترکیبات زائد) بر روی دستگاه رفرکتومتر دیجیتالی (مدل MA 871) اضافه شد و پس از ثابت شدن عدد نمونه بر حسب بریکس با سه قرائت در هر تکرار یادداشت گردید. محاسبه میزان ویتامین ث در آب میوه به روش تیتراسیون (۱۰) و تعیین اسیدیته قابل تیتر (TA) با استفاده از معرف فنل فتالئین انجام شد (۱۲).

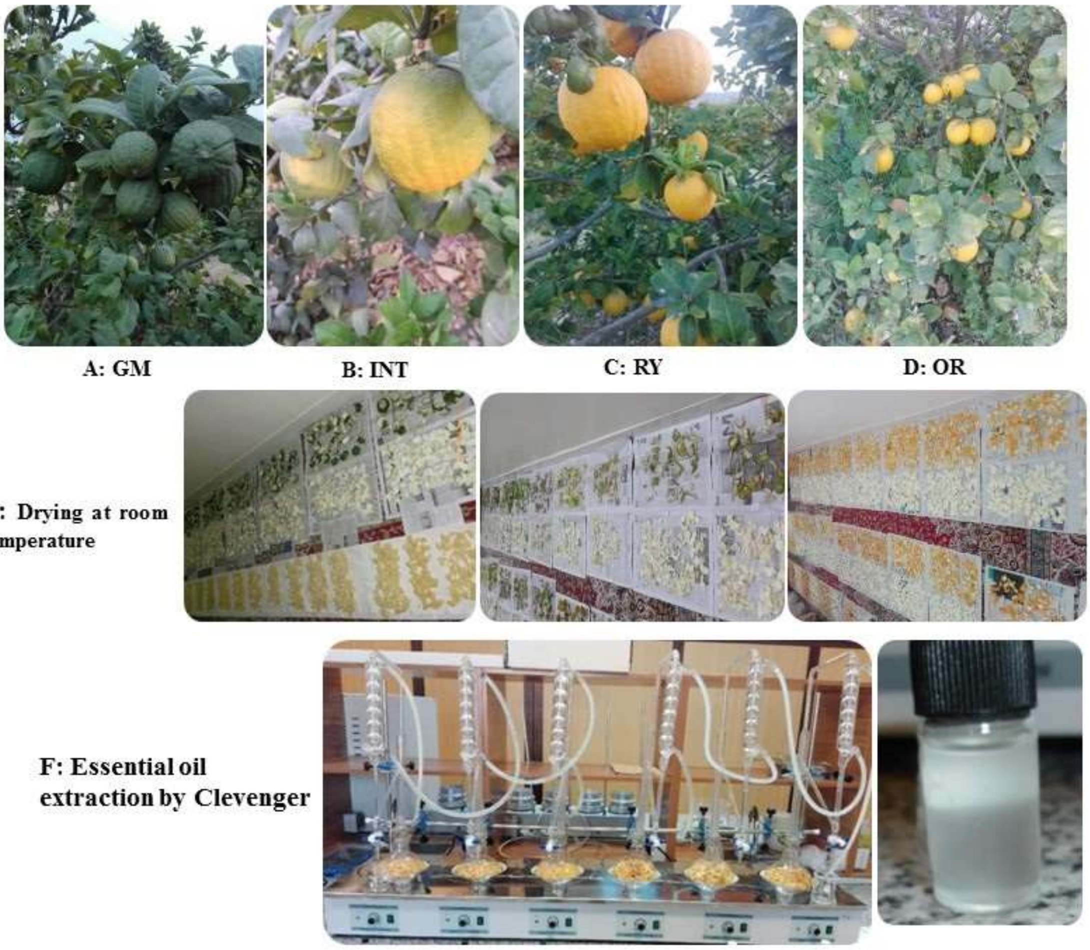
استخراج اسانس

اسانس‌گیری از پوست خشک شده (فلاودو خالص و فاقد سپیدبر) در هر مرحله، توسط دستگاه کلونجر و با روش تقطیر با آب به مدت دو ساعت پس از جوش آمدن نمونه‌ها و در شرایط کاملاً یکسان انجام شد. البته بیشترین میزان استخراج معمولا در حدود یک‌ساعت اول انجام شد ولی جهت استخراج کامل و پیشگیری از خطا تا دو ساعت ادامه یافت (شکل ۱). بازده اسانس بر اساس وزن خشک نمونه‌ها به‌صورت حجمی-وزنی (v/w میلی‌لیتر در ۱۰۰ گرم نمونه خشک) محاسبه شد. عملکرد اسانس از حاصل‌ضرب درصد اسانس در عملکرد ماده خشک فلاودو در میوه در هر مرحله محاسبه شد (میلی‌لیتر در میوه).

جدول ۱- ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی خاک مربوط به باغ مرکبات اترج صغیر واقع شده در شهرستان جهرم

Table 1- Physical and chemical properties of soil related to citron tree orchard located in Jahrom city

منطقه کشت Location area	بافت خاک Soil texture	ماسه Sand (%)	سیلت Silt (%)	رس Clay (%)	پتاسیم K (ppm)	فسفر P (ppm)	نیتروژن N (%)	ترکیبات آلی OC (%)	اسیدیته pH	هدایت الکترولیکی EC (dS.m^{-1})
جهرم-حسین‌آباد Jahrom-Hossein Abad	Sandy-loam	66.5	25	8.5	629	16.6	0.065	0.85	7.39	3.44



شکل ۱- تغییرات ظاهری پوست میوه اترج صغیر (*C. medica* var. medica) در مراحل مختلف بلوغ، خشک کردن و اسانس‌گیری از پوست فلاودو میوه (A: مرحله سبز بالغ، B: مرحله تغییر رنگ، C: مرحله زرد رسیده، D: مرحله بسیار رسیده، E: خشک کردن نمونه‌ها در دمای اتاق و F: استخراج اسانس با استفاده از کلونجر)

Figure 1- Superficial changes of flavedo from citron fruit (*C. medica* var. medica) at different fruit maturity, drying and essential oil extraction from flavedo (A: green mature, B: intermediate, C: ripe-yello, D: over ripe stage, E: drying at room temperature and F: essential oil extraction by Clevenger)

استخراج و اندازه‌گیری پلی‌فنل‌ها با استفاده از دستگاه کروماتوگرافی با کارآیی بالا (HPLC)

ابتدا نمونه‌های گیاهی خشک‌شده را با آسیاب پودر کرده و سپس از الک عبور داده و به‌اندازه ۰/۲ گرم توزین و داخل میکروتیوب ریخته شد. در مرحله بعد، اضافه کردن حلال (۸۵ درصد متانول+ ۱۵ درصد استیک اسید) به مقدار ۱۰ برابر نمونه (۲ میلی‌لیتر حلال) انجام شد و دمیدن گاز ازت به درون میکروتیوب‌ها جهت جلوگیری از اکسیده‌شدن ترکیبات صورت گرفت. میکروتیوب‌ها با پوشش فویل پوشانده شد و درون فریزر (۲۰- درجه سانتی‌گراد) و در تاریکی (ترکیبات پلی‌فنلی به نور حساس هستند) به مدت ۲۴ ساعت قرار گرفت. در مرحله بعد میکروتیوب‌های حاوی عصاره همراه با فویل درون دستگاه اولتراسونیک (توان ۳۰۰ وات) به مدت ۱۵ دقیقه در دمای پایین و در تاریکی قرار گرفت تا ترکیبات فنلی به‌صورت کامل از بافت گیاه جدا شود و وارد حلال شود. در این مرحله نمونه‌ها از دستگاه اولتراسونیک خارج و پوشش فویل آن حذف شد و در دستگاه سانتریفیوژ یخچال‌دار با دمای صفر درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ دقیقه با سرعت ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه قرار گرفت (جهت جدا کردن فاز مایع از جامد). فاز رویی را برداشته و به درون میکروتیوب جدید انتقال داده شد و به آن ان-هگزان (هم‌حجم فاز رویی) اضافه شد. نمونه‌ها به مدت ۱۰ تا ۱۵ ثانیه ورتکس و مجدداً سانتریفیوژ کردن نمونه‌ها به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه در دمای صفر درجه سانتی‌گراد انجام شد (ان-هگزان یک حلال غیرقطبی است که ترکیبات غیرقطبی مانند کلروفیل، پروتئین و چربی‌های موجود در نمونه که غیرقطبی هستند را

در خود حل می‌کند و از ترکیبات پلی‌فنلی جدا می‌کند). در این مرحله یک محلول دو فازه تشکیل می‌شود که فاز رویی شامل ترکیبات مزاحم هگزانی و فاز زیری پلی‌فنل‌ها می‌باشد. سپس با سرنگ، پلی‌فنل قسمت زیرین را کشیده و به نوک سرنگ صافی سرسرنگی (با اندازه منافذ ۰/۱ میلی‌متر) زده‌شده تا کاملاً ناخالصی‌های آن گرفته شود و سپس به ظروف شیشه‌ای مخصوص دستگاه HPLC انتقال یافت و به محفظه دستگاه تزریق شد (۲۵).

مشخصات دستگاه HPLC و روش شناسایی ترکیبات

جهت جداسازی و اندازه‌گیری میزان پلی‌فنل‌ها از دستگاه HPLC مدل Agilent Technologies-1200 series استفاده شد. ستون C18 با طول ۱۵۰ و قطر داخلی ۴/۶ میلی‌متر و قطر ذرات پنج میکرومتر، آشکارساز (Diode Array Detector) در طول موج ۲۸۰ نانومتر و دمای آون ۳۰ درجه سانتی‌گراد استفاده شد. برنامه شستشوی گرادیان، با سرعت شستشوی یک میلی‌لیتر بر دقیقه و حجم تزریق ۲۰ میکرولیتر انتخاب گردید. فاز متحرک گرادیان متانول و اسید فرمیک یک درصد انتخاب شد. جهت شناسایی ترکیبات پلی‌فنولی، مقدار ۲۰ میکرولیتر از عصاره هر نمونه برداشته شد و به دستگاه تزریق گردید. جهت شناسایی و محاسبه درصد نسبی ترکیبات، نمونه‌های استاندارد هر ترکیب (گرید HPLC با خلوص بالای ۹۹ درصد) در غلظت‌های مناسب (صفر تا ۱۰۰۰۰ پی‌پی‌ام) ساخته و به دستگاه تزریق شد و غلظت ترکیب موجود در هر نمونه بر اساس منحنی استاندارد رسم شده محاسبه گردید. از مقایسه زمان بازداری[1] استاندارد با پیک مربوط به کروماتوگرام نمونه (آنالیز کیفی) و جایگذاری سطح زیر منحنی[2] هر نمونه در منحنی استاندارد، آنالیز کمی انجام شد (۲۵). در این بخش، پنج ترکیب فنلی شامل روتین، ترانس فرولیک اسید، هسپریدین، هسپرتین و کوئرستین مورد بررسی و شناسایی قرار گرفت.

آنالیز آماری

تجزیه آماری داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار جامپ (JMP) نسخه ۸ و مقایسه میانگین‌ها بر اساس آزمون توکی (HSD) انجام شد.

نتایج و بحث

تجزیه واریانس صفات بیوشیمیایی عصاره میوه اترج صغیر

نتایج آنالیز واریانس داده‌ها نشان‌دهنده تأثیر معنی‌دار مرحله بلوغ میوه و نوع اندام و اثرات متقابل آن بر کلیه صفات اندازه‌گیری شده بود (جدول ۲).

میزان فلاون و فلاونول و فلاونوئید کل

مقایسه میانگین مربوط به تأثیر تیمارها بر میزان فلاون و فلاونول بخش‌های مختلف میوه اترج صغیر در مراحل مختلف بلوغ در جدول ۳ آورده شده است. همان‌طور که مشاهده می‌شود بالاترین میزان فلاون و فلاونول (۰/۳۷۷ میلی‌گرم کوئرستین در گرم نمونه خشک) مربوط به فلاودو در مرحله بسیار رسیده و بعد از آن (۰/۳۲۴ میلی‌گرم) در مرحله زرد رسیده بود و کمترین مقدار (۰/۰۰۱ میلی‌گرم) مربوط به آب‌میوه در مرحله بسیار رسیده بود. میزان آن در فلاودو طی بلوغ روند افزایشی داشت به‌طوری که بیشترین میزان در مرحله بسیار رسیده اندازه‌گیری شد. میزان فلاون و فلاونول در آلبیدو دستخوش تغییرات زیادی بود به‌طوری که با تغییر مرحله رشد از سبز رسیده به مرحله تغییر رنگ میزان این ترکیب کاهش پیدا کرد و در مرحله رسیده زرد مقدار آن افزایش یافت (افزایش ۱۳ درصدی) و با پیشرفت بلوغ در مرحله بسیار رسیده میزان آن کاهش شدیدی یافت (کاهش حدود ۱۹۵ درصدی). میزان فلاون و فلاونول در تفاله دارای تغییراتی بود به‌طوری که با پیشرفت بلوغ مقدار آن ابتدا کاهش یافت و در مرحله سوم رسیدن میوه (زرد رسیده) مجددا افزایش و در مرحله بسیار رسیده کاهش یافت و به حداقل مقدار خود رسید (۰/۰۱۴ میلی‌گرم). میزان این ترکیب در آب‌میوه نیز دارای تغییراتی بود به‌طوری که با تغییر مرحله رشد از سبز رسیده به مرحله دوم (تغییر رنگ) مقدار آن افزایش پیدا کرد و در مرحله زرد رسیده مجددا افزایش یافت (۰/۰۱۷ میلی‌گرم) و در مرحله بسیار رسیده کاهش شدیدی یافت و به حداقل مقدار خود رسید (۰/۰۰۱ میلی‌گرم). در بررسی اثرات ساده مشاهده می‌گردد که بدون در نظر گرفتن نوع اندام، میزان فلاون و فلاونول در طی بلوغ میوه ابتدا کاهش معنی‌داری یافت به‌طوری که به کمترین میزان (۰/۰۹۹ میلی‌گرم) در مرحله تغییر رنگ رسید. بیشترین میزان (۰/۱۲۵ میلی‌گرم) در مرحله زرد رسیده اندازه‌گیری شد. بدون در نظر گرفتن مرحله رشد، بیشترین میزان فلاون و فلاونول (۰/۲۹۵ و ۰/۱۱۳ میلی‌گرم) به ترتیب مربوط به نمونه‌های فلاودو و آلبیدو بود و کمترین میزان (۰/۰۱۰ میلی‌گرم) مربوط به نمونه آب‌میوه اترج صغیر بود (جدول ۳).

بالاترین میزان فلاونوئید کل (۱۶/۳۸ میلی‌گرم کوئرستین در گرم نمونه خشک) مربوط به بخش فلاودو میوه در مرحله بسیار رسیده و بعد از آن آلبیدو (۱۱/۲۴ میلی گرم) در مرحله زرد رسیده بود (جدول ۳). میزان فلاودو در طی بلوغ روند افزایشی داشت و به بیشترین مقدار در مرحله آخر بلوغ رسید. گرچه بین مراحل سبز رسیده و مرحله تغییر رنگ اختلاف معنی‌داری از نظر آماری بین آنها وجود نداشت. میزان

1- Retention Time

2- Peak Area

فلاونوئید کل در آلبیدو دســـتخوش تغییرات زیادی بود به‌طوری که با تغییر مرحله رشد از سبز رسیده به مرحله تغییر رنگ، میزان این ترکیب کاهش پیدا کرد و با تغییر فاز به مرحله زرد رســیده افزایش شـــدیدی یافت (افزایش ۱۰۵ درصدی) و با پیشرفت بلوغ در مرحله بسیار رسیده میزان آن مقـداری کاهش یافت (کاهش حدود ۲۳ درصـــدی). میزان این ترکیب در تفاله میوه نیز دارای تغییراتی بود بطوری که با پیشرفت بلوغ، مقدار آن ابتدا شــدیدا کاهش یافت (کمتر از نصــف) و در مرحله سوم رسیدن میوه (رسیده زرد) مجددا افزایش و در مرحله بسیار رسیده به حداکثر مقدار خود رسید (۴/۹۱ میلی‌گرم).

جدول ۲-تجزیه واریانس تاثیر مرحله بلوغ میوه و بخش‌های مختلف میوه بر صفات بیوشیمیایی میوه اترج صغیر

Table 2- ANOVA for the effect of fruit maturity stage and different fruit parts on biochemical traits of citron fruit

منبع تغییرات S.O.V	درجه آزادی df	فلاون و فلاونول Flavone and Flavonol	فنل کل Total phenol	میزان فلاونوئید Flavnoid content	فعالیت آنتی اکسیدانی Antioxidant activity
بلوک Block	3	0.00024	0.12634	1.0256	23.220
مرحله بلوغ Maturity stage (A)	3	0.00209 **	0.23102 **	75.852 **	1925.8 **
بخش‌های مختلف میوه Different fruit parts (B)	3	0.26993 **	4.7855 **	281.20 **	2509.3 **
مرحله بلوغ× بخش میوه A×B	9	0.01149 **	0.74810 **	28.164 **	732.50 **
ضریب تغییرات C.V (%)	-	16.89	22.03	20.73	18.15

** : Significant at 1% of probability level. ** معنی‌دار در سطح احتمال ۱ درصد

جدول ۳- میزان ترکیبات فلاون و فلاونول و فلاونوئید کل موجود در بخش‌های مختلف میوه اترج صغیر در مراحل مختلف بلوغ میوه

Table 3- Flavone and flavonoles and total flavonoide exist in different parts of citron fruit during fruit maturation

مراحل بلوغ میوه Fruit maturity stages	پوست بیرونی Flavedo	سپیدبر Albedo	تفاله Pulp	آبمیوه Fruit juice	میانگین Mean
Flavon and Flavonoles (mg/g dry weight) فلاون و فلاونون کل					
رسیده سبز Green mature	0.232d	0.196d	0.039fg	0.010gh	0.117AB
تغییر رنگ Intermediate	0.257c	0.102e	0.025fgh	0.012gh	0.099C
رسیده زرد Ripe-yellow	0.324b	0.115e	0.045f	0.017fgh	0.125A
بسیار رسیده Over-ripe	0.377a	0.039fg	0.014gh	0.001h	0.108BC
Mean میانگین	0.295A	0.113B	0.031C	0.010D	-
Total flavonoid (mg/g dry weight) فلاونوئید کل					
رسیده سبز Green mature	4.28ef	7.93d	3.14f	0g	3.84C
تغییر رنگ Intermediate	4.58ef	5.48e	1.24g	0.088g	2.85D
رسیده زرد Ripe-yellow	9.49c	11.24b	3.22f	0g	5.99B
بسیار رسیده Over-ripe	16.38a	9.14cd	4.91e	0.385g	7.70A
Mean میانگین	8.68A	8.44A	3.13B	0.12C	*

حروف متفاوت در هر ستون و در ردیف نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار بین میانگین مقادیر با توجه به آزمون توکی (p<0.01) هستند.

Means followed by the different letters in each column and row are significantly different at 1% probability level using the Tukey HSD test (P<0.01)

بین مرحله اول و سوم بلوغ میوه اختلاف معنی‌داری وجود نداشت. تغییرات میزان فلاونوئید در آب‌میوه از نظر آماری معنی‌دار نبود (جدول ۳). در بررسی اثرات ساده مشاهده می‌گردد که بدون در نظر گرفتن نوع اندام میزان فلاونوئید کل در طی بلوغ میوه روند کاهشی معنی‌داری داشت. به‌طوری که کمترین میزان (۲/۸۵ میلی‌گرم) مربوط به مرحله تغییر رنگ و بیشترین میزان (۷/۷۰ میلی‌گرم) در مرحله بسیار رسیده اندازه‌گیری شد. میزان این تغییرات از مرحله دوم بلوغ میوه تا مرحله چهارم بیش از ۱۷۰ درصد بود. بدون در نظر گرفتن مرحله بلوغ، بیشترین میزان فلاونوئید کل (۸/۶۸ و ۸/۴۴ میلی‌گرم) به ترتیب مربوط به نمونه‌های فلاودو و آلبیدو بود و کمترین میزان (۰/۱۲) مربوط به نمونه آب‌میوه اترج صغیر بود (جدول ۳).

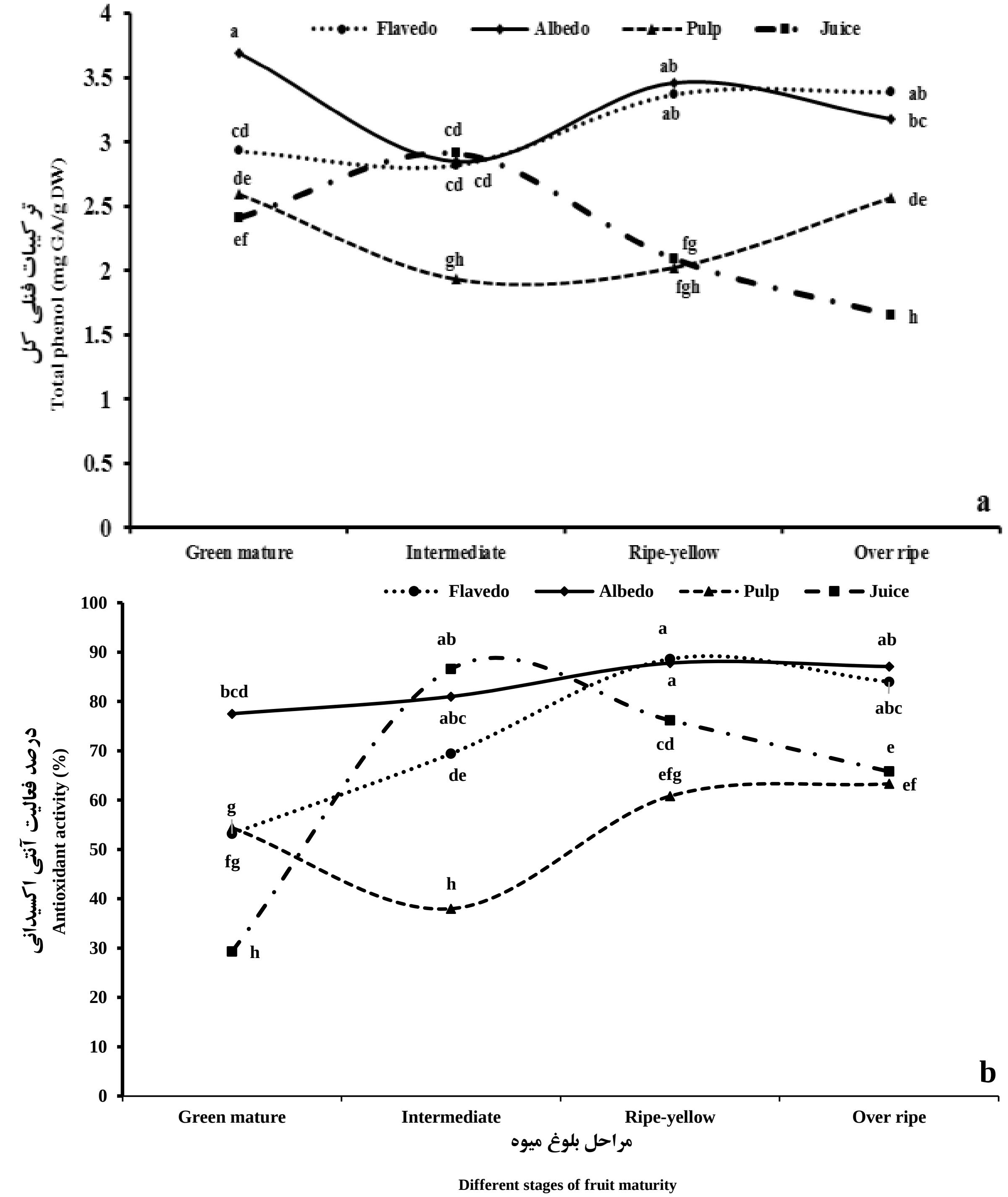
فلاوونوئیدها متابولیت‌های ثانویه‌ای هستند که به طور طبیعی در گیاهان وجود دارند و خواص بیولوژیکی قابل توجهی دارند. این مواد نقش مهمی در محافظت از گیاهان در برابر اشعه ماوراء بنفش (UV) دارند. این ترکیبات به دلیل تلخ بودن مانع از تغذیه گیاه‌خوران از آنها می‌شوند. بعلاوه، این مواد دارای خصوصیات آنتی‌باکتریال هستند و گیاه را از پاتوژن‌ها و آلودگی‌ها محافظت می‌کنند (۳۲). فلاوونوئیدها مسئول رنگ گرفتن گل‌ها و میوه‌ها هستند. تاکنون صدها فلاوونوئید معرفی و گزارش شده‌اند. مرکبات به دلیل مقادیر زیادی از گلیکوزیدهای فلاوونوئیدی که در طول سنتز فلاوونوئید در میوه‌ها و برگ‌ها انباشته می‌شوند، دارای اهمیت زیادی هستند. میوه‌های مرکبات (پرتقال، لیمو، گریپ‌فروت، نارنگی، لیموترش، نارنج) منبع قابل توجهی از انواع فلاوونوئیدها هستند (۳۲). طبق تحقیقات انجام شده توسط همتی و امیدبیگی (۱۸)، بیشترین میزان فلاونوئید در گریپ‌فروت مارش در مرحله نارس بود. نتایج تحقیق آنها نشان داد که با رشد میوه گریپ‌فروت، فلاونویید (نارنجنین) آن کاسته می‌شود و بیشترین میزان فلاونوئید مربوط به مرحله اول برداشت (نارس) است (۱۸). یو و همکاران (۴۰) بیشترین میزان فلاونویید موجود در میوه سه رقم Yuzu (واندو، گوهونگ و سادونگ) و در سه زمان بلوغ (نارس، نیمه‌رسیده و رسیده بالغ) را در بخش فلاویدو و آلبیدو گزارش نمودند. طبق گزارش این محققین میزان ترکیبات فلاونوئید، فنول کل و ویتامین ث در هر سه رقم در بخش پوست بیشتر از گوشت می‌باشد (۴۰).

میزان ترکیبات فنلی کل

مقایسه میانگین مربوط به تأثیر تیمارها بر میزان ترکیبات فنلی کل بخش‌های مختلف میوه اترج صغیر در مراحل مختلف بلوغ در شکل ۲-a منعکس شده است. همان‌طور که مشاهده می‌شود بالاترین میزان ترکیبات فنلی کل (۳/۶۹ میلی‌گرم گالیک اسید در گرم نمونه خشک) مربوط به بخش آلبیدو در مرحله سبز رسیده و بعد از آن در مرحله زرد رسیده (۳/۴۶ میلی‌گرم) و کمترین مقدار (۱/۶۵) مربوط به تفاله در مرحله بسیار رسیده بود. میزان ترکیبات فنلی کل در بخش فلاودو دستخوش تغییرات بود به‌طوری که با تغییر مرحله رشد از سبز رسیده به مرحله تغییر رنگ میزان این ترکیب کاهش پیدا کرد و در مرحله زرد رسیده مقدار آن افزایش یافت (افزایش ۱۹/۵ درصدی). بین مرحله سوم و چهارم بلوغ میوه اختلاف معنی‌داری از نظر آماری وجود نداشت (شکل ۲-a). میزان این ترکیب در آلبیدو نیز دارای تغییراتی بود و با تغییر مرحله رشد از سبز رسیده به تغییر رنگ میزان این ترکیب کاهش پیدا کرد و با تغییر فاز به مرحله زرد رسیده افزایش یافت و با پیشرفت بلوغ در مرحله بسیار رسیده میزان آن مقداری کاهش یافت (کاهش حدود ۹ درصدی). میزان فنل کل در تفاله نیز تغییرات زیادی داشت به‌طوری که با تغییر مرحله رشد از سبز رسیده به مرحله تغییر رنگ میزان این ترکیب کاهش پیدا کرد (کاهش ۳۴ درصدی) و با تغییر فاز به مرحله زرد رسیده افزایش یافت و با پیشرفت بلوغ در مرحله بسیار رسیده میزان آن مقداری افزایش یافت (افزایش حدود ۲۷ درصدی). در آب‌میوه نیز دارای تغییراتی بود به‌طوری که با پیشرفت بلوغ مقدار آن ابتدا افزایش یافت و در مرحله سوم و چهارم رسیدن میوه، میزان این ترکیب کاهش یافت به‌طوری که در مرحله بسیار رسیده به حداقل مقدار خود رسید (۱/۶۵ میلی‌گرم) (شکل ۲-a). در بررسی اثرات ساده مشاهده می‌گردد که بدون در نظر گرفتن نوع اندام، میزان ترکیبات فنلی کل در طی بلوغ میوه ابتدا روند کاهشی معنی‌داری داشت. به‌طوری که کمترین میزان (۲/۶۳ میلی‌گرم) مربوط به مرحله تغییر رنگ و بیشترین میزان (۲/۹۱ میلی‌گرم) در مرحله سبز رسیده اندازه‌گیری شد. گرچه بین مرحله دوم و سوم بلوغ میوه اختلاف معنی‌داری از نظر آماری وجود نداشت (جدول ۴). بدون در نظر گرفتن مرحله رشد، بیشترین میزان فنل کل (۳/۲۹ و ۳/۱۲ میلی‌گرم) به ترتیب مربوط به نمونه‌های آلبیدو و فلاودو بود و کمترین میزان (۲/۲۶ میلی‌گرم) مربوط به نمونه آب‌میوه بود (جدول ۴).

فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره

بالاترین میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی (۸۸/۶ درصد) مربوط به بخش فلاودو در مرحله زرد رسیده و بعد از آن آلبیدو (۸۷/۸ درصد) در مرحله زرد رسیده بود و کمترین مقدار (۲۹/۳ درصد) مربوط به آب‌میوه در مرحله سبز رسیده اندازه‌گیری شد. میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی فلاودو در طی بلوغ میوه روند افزایشی داشت و این افزایش از مرحله دوم رسیدن به مرحله سوم چشمگیر بود (افزایش حدود ۲۸ درصدی)، ولی از مرحله سوم (زرد رسیده) به مرحله چهارم رسیدن (بسیار رسیده) مقدار آن کمی کاهش یافت (۸۴/۰ درصد) (شکل ۲-b).



شکل ۲- اثر نوع نمونه و مرحله بلوغ میوه بر میزان ترکیبات فنلی کل (a) و فعالیت آنتی‌اکسیدانی (b) بخش‌های مختلف میوه اترج صغیر (*C. medica* var. medica)

Figure 2- The effect of sample type and fruit maturity on total phenolic compounds (a) and antioxidant activity (b) of citron fruit (*C. medica* var. medica)

جدول ۴- اثر مرحله بلوغ میوه و بخش‌های مختلف میوه بر میزان ترکیبات فنلی و فعالیت آنتی‌اکسیدانی میوه اترج صغیر (*C. medica* var. medica)

Table 4- The effect of fruit maturity and different fruit parts on total phenolic compounds and antioxidant activity of citron fruit (*C. medica* var. medica)

		ترکیبات فنلی کل Total phenolic compounds	فعالیت آنتی‌اکسیدانی Antioxidant activity
مراحل بلوغ میوه Fruit maturity stages	Green mature رسیده سبز	2.91a	53.60c
	Intermediate تغییر رنگ	2.63b	68.70b
	Ripe-yellow رسیده زرد	2.74b	78.35a
	Over-ripe بسیار رسیده	2.70b	75.05a
بخش‌های مختلف میوه Different fruit parts	Flavedo پوست بیرونی	3.13b	73.80b
	Albedo سپیدبر	3.29a	83.35a
	Pulp تفاله	2.28c	54.13d
	Fruit juice آب‌میوه	2.27c	64.48c

حروف مشابه در هر ستون در رابطه با هر صفت نشان‌دهنده عدم وجود اختلاف معنی‌دار بین میانگین‌ها با توجه به آزمون توکی ($p<0.05$) می‌باشد.

Means followed by the same letters in each column as relation to each factor are not significantly different at 5% of probability level using the Tukey HSD test.

میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی در آلبیدو دستخوش تغییرات بود و با تغییر مرحله رشد از سبز رسیده به مرحله تغییر رنگ میزان این ترکیب افزایش پیدا کرد و با تغییر فاز به مرحله زرد رسیده مجددا افزایش یافت (۸۷/۸ درصد) و با پیشرفت بلوغ در مرحله بسیار رسیده میزان آن مقداری کاهش یافت (۸۷/۱ درصد). فعالیت آنتی‌اکسیدانی در تفاله نیز دارای تغییراتی بود بطوری که با پیشرفت بلوغ مقدار آن ابتدا کاهش یافت و در مرحله سوم رسیدن میوه افزایش و در مرحله بسیار رسیده به حداکثر مقدار خود رسید (۶۳/۳ درصد). میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی در آب‌میوه دستخوش تغییرات زیادی بود به‌طوری که از مرحله سبز رسیده به مرحله تغییر رنگ میزان آن افزایش شدیدی یافت (افزایش حدود ۱۹۶ درصدی) و در مرحله زرد رسیده مقدار آن کاهش یافت (۷۶/۲ درصد) و در مرحله چهارم رسیدن (بسیار رسیده) مجددا کاهش یافت (۶۵/۸ درصد) (شکل 2-b). در بررسی اثرات ساده (جدول شماره ۴) مشاهده می‌گردد که بدون در نظر گرفتن نوع اندام، میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی در طی بلوغ میوه ابتدا روند افزایشی داشت، ولی از مرحله زرد رسیده به مرحله بسیار رسیده مقدار آن کمی کاهش یافت (۷۵/۰ درصد). به‌طوری که کمترین میزان (۵۳/۶ درصد) مربوط به مرحله سبز رسیده و بیشترین میزان (۷۸/۴ درصد) در مرحله زرد رسیده اندازه‌گیری شد. میزان این تغییرات از مرحله اول بلوغ میوه تا مرحله سوم ۴۶ درصد بود. بدون در نظر گرفتن مرحله رشد بیشترین میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی (۸۳/۳ و ۷۳/۸ درصد) به ترتیب مربوط به نمونه‌های آلبیدو و فلاودو بود و کمترین میزان (۵۴/۱ درصد) مربوط به نمونه تفاله بود (جدول ۴).

براساس تحقیق انجام شده توسط زو و همکاران (۳۹) مشخص گردید، همزمان با بلوغ میوه‌های پونکان (*Citrus poonensis* Hort. ex Tanaka) و نوعی گریپ‌فروت (هویو Huyou) اسیدهای فنلی موجود در پوست و گوشت کاهش یافت، ولی در نهایت میزان آنها در پوست بیشتر از گوشت بوده است (۳۹) که با نتایج تحقیق حاضر مطابقت دارد. از طرف دیگر، فتاحی و همکاران (۱۳) گزارش کردند که میزان فنل کل ارقام مختلف پرتقال طی رسیدن ابتدا کاهش و سپس افزایش یافت. طبق گزارشات انجام شده، ظرفیت آنتی‌اکسیدانی، فنل کل و ویتامین ث در پوست برخی ارقام مرکبات (۱۶ بیوتیپ پیوند شده روی پایه نارنج) بالاتر از گوشت میوه بود.

همچنین میزان فنل کل در گوشت میوه تا حدودی بالاتر از پوست گزارش شد و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی در پوست و گوشت میوه‌ها همبستگی ضعیفی با ویتامین ث و فنول کل داشت (۱). در تحقیق دیگری در ارتباط با واریته ای از اترج یا بالنگ انگشت (Finger citron)، فعالیت آنتی‌اکسیدانی اسانس میوه طی سه مرحله بلوغ (IM، INT و MAT) با دو روش اندازه‌گیری گردید و گزارش شده که در هر دو روش بالاترین میزان فعالیت‌آنتی اکسیدانی مربوط به میوه نابالغ بوده است و طی بلوغ فعالیت آنتی‌اکسیدانی اسانس کاهش یافته است (۳۸) که با نتایج تحقیق حاضر در تضاد می‌باشد. از طرف دیگر برخی محققین افزایش فعالیت فعالیت آنتی‌اکسیدانی در مرکبات با پیشرفت بلوغ را گزارش کرده‌اند که با نتایج این تحقیق همخوانی دارد. در تحقیقی که توسط یو و همکاران (۴۰) در رابطه با فعالیت آنتی‌اکسیدانی و میزان ترکیبات فنلی کل و بیوفلاونوئید در عصاره پوست و گوشت گونه‌ای مرکبات *Citrus junos* Sieb ex Tanaka انجام شد، نتایج نشان داد که بیشترین فعالیت آنتی‌اکسیدانی، ترکیبات فنلی کل و بیوفلاونوئید مربوط به بخش پوست، در مرحله رسیده بالغ می‌باشد.

جدول ۵-تجزیه واریانس تاثیر مرحله بلوغ میوه بر ویژگی‌های آب‌میوه و تغییرات فیزیکی بخش‌های مختلف میوه اترج صغیر (*C. medica* var. medica)

Table 5 - ANOVA for the effect of maturity stage on fruit juice properties and physical changes of different parts of citron fruit *C. medica* var. medica

منبع تغییرات S.O.V	درجه آزادی df	وزن تر فلاودو Flavedo fresh weight	وزن خشک فلاودو Flavedo dry weight	وزن تر آلبیدو Albedo fresh weight	وزن خشک آلبیدو Albedo dry weight	نسبت وزن تر فلاودو به وزن تر میوه Flavedo F.W./fruit F.W.	نسبت وزن خشک فلاودو به آلبیدو Flavedo D.W./Albedo D.W.	وزن تر میوه Fruit fresh weight
بلوک Block	3	43.475	6.320	98.752	2.915	0.001	0.070	3966.684
مرحله بلوغ Maturity stage	3	1174.506**	9.817**	19.985ns	6.241*	0.004**	0.237**	7516.307**
منبع تغییرات S.O.V	قطر میوه Fruit diameter	ارتفاع میوه Fruit height	حجم آب‌میوه Juice volume	اسیدیته pH	مواد جامد محلول TSS	اسیدیته قابل تیتر TA	نسبت مواد جامد محلول به اسیدیته قابل تیتر TSS/TA	ویتامین ث Vitamin C
بلوک Block	0.432	0.821	88.5	0.0074	1.262	0.035	0.881	0.308
مرحله بلوغ Maturity stage	1.693ns	3.807ns	1100.49**	0.079**	4.014**	1.803ns	0.529ns	1.784**

*، ** و ns به ترتیب معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد، ۱ درصد و عدم معنی‌داری.

*, ** ns: Significant at 5% and 1% of probability level and non-significant, respectively.

در بخش گوشت میوه نیز بیشترین میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی در مرحله رسـیده بالغ بود اما میزان ترکیبات فنولی‌کل و بیوفلاونوئید در مرحله نارس بیشـترین مقدار مشـاهده گردید (۴۰). در پژوهش انجام شـده در رابطه با پرتقال خونی رقم سـانگین، مشـخص گردید فعالیت آنتی‌اکسـیدانی میوه بـا پیشـرفت بلوغ افزایش یافت (۱۷). فعالیت آنتی‌اکسـیدانی یک اندام یا نمونه گیاهی تا حد زیادی بسـتگی به ترکیبات غالب موجود در آن دارد. گرچه در برخی موارد ممکن اسـت ویژگی سینرژیستی یا آنتاگونیستی برخی از ترکیبات جزئی‌تر نیز روی این ویژگی اثرگذار باشـد. در رابطه با مرکبات وجود ترکیباتی مانند اسـانس، فنول‌ها، فلاونوئیدها، کاروتنوئیدها و اسـید اسـکوربیک بر فعالیت آنتی‌اکسـیدانی اندام مورد سـنجش تاثیرگذار می‌باشـد. البته عواملی مانند نوع گونه یا رقم، شـرایط محیطی کشـت (به‌ویژه دما و رطوبت نسبی محیط)، روش خشک کردن، مرحله بلوغ و روش ارزیابی فعالیت‌های بیولوژیکی نمونه‌های گیاهی در نتایج ارزیابی ویژگی‌های بیوشیمیایی نمونه مورد آزمایش تاثیرگذار می‌باشد (۴، ۹ و ۳۸).

تغییرات فیزیکی بخش‌های مختلف میوه اترج صغیر

نتـایج مربوط بـه تـاثیر مرحلـه بلوغ میوه بر تغییرات فیزیکی بخش‌های مختلف میوه اترج صـغیر در جدول ۵ گزارش شـده اسـت. همانطور که مشـاهده می‌شود تاثیر مرحله بلوغ میوه بر کلیه صفات به جز وزن تر آلبیـدو، قطر میوه و ارتفـاع میوه معنی‌دار گردیـد. حـداکثر میزان وزن تر فلاودو در مرحله بسیار رسیده (۷۴/۸۶ گرم) اندازه‌گیری شد و بین سایر تیمارها از نظر آماری اختلاف معنی‌داری وجود نداشت (شکل ۳-a). میزان وزن خشک فلاودو نیز دارای تغییراتی بود به‌طوری که از مرحله سـبز رسـیده به تغییر رنگ میزان آن کاهش یافت و به حداقل مقدار خود رسید (۸/۷۹ گرم) و در مرحله زرد رسیده میزان وزن خشـک فلاودو افزایش یافت (۹/۲۰) و در مرحله بسـیار رسیده مجددا افزایش یافت و حداکثر میزان (۱۲/۱۴ گرم) در این مرحله اندازه‌گیری شد (شکل ۳-b). تغییرات وزن تر آلبیدو در مراحل بلوغ، از نظر آماری اختلاف معنی‌داری با یکدیگر نداشـتند در حالی که میزان وزن خشک آلبیدو تحت تأثیر مرحله رسـیدن میوه قرار گرفته اسـت به‌طوری که حداکثر میزان آن (۱۱/۲۵ گرم) در مرحله سبز رسیده اندازه گیری شد و بـا پیشـرفـت بلوغ میزان آن کاهش یافت و کمترین میزان (۸/۴۱ گرم) در مرحله بسیار رسیده بود (شکل ۳-b). نسبت وزن تر فلاودو به وزن تر میوه از مرحله اول رسـیدن (سـبز رسیده) به مرحله دوم (تغییر رنگ) کمی کاهش یافت (۰/۲۰۲) و در مرحله زرد رسـیده و بسـیار

رسیده میزان آن افزایش یافت و حداکثر میزان آن (۰/۲۷۰) در مرحله بسیار رسیده اندازه‌گیری شد (شکل ۳-c). بیشترین نسبت وزن خشک فلاودو به وزن خشک آلبیدو (۱/۴۴) مربوط به مرحله بسیار رسیده بود و سایر تیمارها در یک گروه آماری قرار داشتند (شکل ۳-c). همچنین بیشترین میزان وزن تر میوه مربوط به مرحله بسیار رسیده بود (۲۷۷/۷۸ گرم) و سایر تیمارها در یک گروه آماری قرار داشتند (شکل ۳-d). ارتفاع میوه دستخوش تغییرات در طی بلوغ شدند ولی این تغییرات از نظر آماری اختلاف معنی‌داری نداشتند (جدول ۶). در تحقیقی روند تغییر ترکیب‌های زیست فعال و خصوصیات فیزیکی میوه دو رقم لیموترش لیسبون (*Citrus limon* cv. Lisbon) و کوک اورکا (*C. limon* cv. Cook Eureka) طی رسیدن مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج نشان داد، به طور کلی وزن میوه طی رسیدن همزمان با صفات طول، عرض، حجم، ضخامت پوست و درصد عصاره افزایش یافت (۳۱). رشد و بزرگ شدن میوه نتیجه تقسیم سلولی و متعاقب آن بزرگ شدن سلولی است. در نتیجه با افزایش رشد میوه مرکبات بر وزن میوه افزوده می‌شود که به افزایش عملکرد وزن خشک می‌انجامد. با گذشت زمان و دریافت نور، آب و درجه حرارت بیشتر، میزان سنتز مواد آلی در اندام‌های مختلف از جمله میوه زیاد می‌شود که نتیجه آن افزایش عملکرد وزن میوه است. در تحقیقی دیگر گزارش شده است که میوه‌های مرکبات دارای چهار مرحله رشدی می‌باشند. رشد میوه‌ها در مرحله سوم که کیسه‌های آب میوه توسعه می‌یابند به حداکثر اندازه می‌رسند (۱۵). نتایج تحقیق همتی و امید بیگی (۱۸) بر روی میوه گریپ فروت مارش نشان داد که با گذشت زمان میزان وزن تر گریپ‌فروت مارش افزایش یافته است. در تحقیقی اثر پنج پایه بر ویژگی‌های فیزیکی، مکانیکی و شیمیایی میوه نارنگی رقم جدید یاشار طی مراحل رسیدن مورد بررسی قرار گرفت و اندازه میوه‌ها طی زمان‌های مورد بررسی، تغییرات زیادی نداشت (۱۲). نتایج تحقیق فتاحی‌مقدم و همکاران (۱۱) در ارزیابی ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی میوه‌های نارنگی ارقام جدید نوشین *Citrus reticulate* cv. (Noushin) و شاهین (*Citrus reticulate* cv. Shahin) طی زمان‌های مختلف برداشت نشان داد که اندازه میوه، میانگین قطرهای حسابی، هندسی و هم ساز در هر دو رقم طی برداشت‌های بعدی نسبت به برداشت اول تغییر معنی‌داری نداشت. از آنجا که رشد میوه مرکبات تابع یک الگوی سیگموئید است، افزایش وزن میوه، سریع است و با پایان فاز تقسیمات سلولی از این میزان کاسته می‌شود، ولی افزایش قطر میوه در مقایسه با وزن آن از روند یکنواخت‌تری برخوردار است (۳۹).

تغییرات فیزیکی و شیمیایی آب میوه اترج صغیر

تاثیر مرحله بلوغ میوه بر همه ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی آب میوه اترج صغیر به جز میزان اسیدیته قابل تیتر و نسبت مواد جامد محلول به اسیدیته قابل تیتر (TSS/TA) معنی‌دار گردید (جدول ۵). کمترین میزان حجم آب‌میوه (۳۶/۹۲ میلی‌لیتر) در مرحله سبز رسیده بود و با پیشرفت بلوغ میزان آن افزایش یافت به‌طوری که بیشترین میزان آن (۷۳/۱۳ میلی‌لیتر) در مرحله بسیار رسیده اندازه‌گیری شد (جدول ۶). از نظر میزان اسیدیته بین سه مرحله اول بلوغ اختلاف معنی‌داری از نظر آماری وجود ندارد و در مرحله بسیار رسیده اسیدیته کاهش یافته است (جدول ۶). میزان مواد جامد محلول موجود در آب‌میوه تحت تأثیر مرحله رسیدن قرار گرفته است به‌طوری که بیشترین میزان در مرحله سبز رسیده (۱۰/۲۳ درصد) اندازه‌گیری شد و با پیشرفت بلوغ میزان آن کاهش یافت و کمترین میزان آن در مرحله بسیار رسیده (۷/۸۳ درصد) بود (جدول ۶).

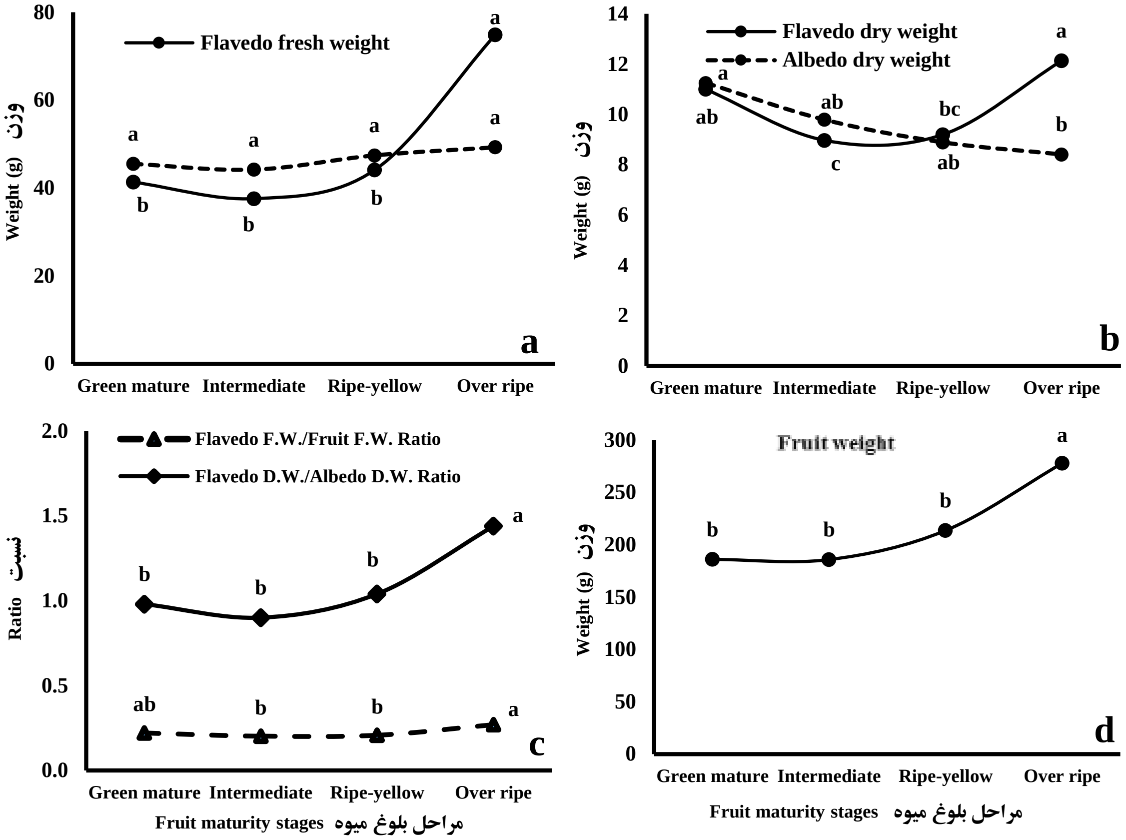
جدول ۶- تأثیر مرحله رسیدن میوه بر ویژگی‌های آب‌میوه اترج صغیر (*C. medica* var. medica)

Table 6 - The effect of fruit ripening stage on the juice characteristics of citron fruit *C. medica* var. medica

مراحل بلوغ میوه **Fruit maturity stages**	حجم آبمیوه **Fruit Juice (ml)**	اسیدیته **pH**	مواد جامد محلول **TSS (%)**	اسیدیته قابل تیتر **TA (%)**	نسبت مواد جامد محلول به اسیدیته قابل تیتر **TSS/TA**	ویتامین ث **Vitamin C (mg/100 g)**
رسیده سبز Green mature	36.92 c	2.88 a	10.23 a	2.48 a	4.16 a	36.81 a
تغییر رنگ Intermediate	39.20 bc	2.97 a	9.47 ab	2.43 a	3.94 a	30.04 a
رسیده زرد Ripe-yellow	51.61 b	2.91 a	9.10 b	2.00 a	4.61 a	28.32 b
بسیار رسیده Over-ripe	73.13 a	2.65 b	7.83 c	1.90 a	4.17 a	20.53 c

* وجود حروف مشترک در هر ستون نشان‌دهنده عدم وجود اختلاف معنی‌دار بر اساس آزمون توکی ($p<0.05$) می‌باشد.

* In each column means with similar letter are not significant using the Tukey's HSD test ($p<0.05$).



شکل ۳- تغییرات فیزیکی بخش‌های مختلف میوه اترج صغیر (*C. medica* var. medica) تحت تاثیر مرحله رسیدن میوه (F.W.: وزن تر، D.W.: وزن خشک)

Figure 3- Physical fluctuations from different parts of citron fruit (*C. medica* var. medica) influenced by fruit ripening (F.W.: fresh weight, D.W.: dry weight)

اختلاف معنی‌داری از نظر میزان اسیدیته قابل تیتر و میزان TSS به TA در مراحل رسیدن میوه وجود نداشت (جدول ۶). میزان ویتامین ث تحت تأثیر مرحله رسیدن قرار گرفته است به‌طوری که بیشترین میزان آن در مرحله سبز رسیده (۳۶/۸۱ میلی‌گرم در ۱۰۰ گرم) اندازه‌گیری شد و با پیشرفت بلوغ میزان ویتامین ث کاهش یافت و کمترین میزان در مرحله بسیار رسیده (۲۰/۵۳ میلی‌گرم در ۱۰۰ گرم) مشاهده شد (جدول ۶). فتاحی و همکاران (۱۴)، به نقل از بیاله (۱۹۶۰) بیان کردند که افزایش مواد جامد محلول و قند کل میوه طی رسیدن به دلیل هیدرولیز نشاسته به قند و همچنین کاهش در میزان تجزیه قند طی تخمیر است. معیار برداشت برخی از ارقام مرکبات بر اساس میزان TSS و نسبت TSS به TA است که همان ترش و شیرینی مزه هم می‌گویند. زمان برداشت میوه مرکبات در منطقه شمال به درصد قند و اسیدیته ارتباط دارد و در نتیجه بین میزان قند میوه و اسیدیته در زمان برداشت معمولا تعادلی باید وجود داشته باشد (۱۴). به طور معمول، نسبت این دو شاخص بیان کننده طعم و مزه میوه است و همواره مورد توجه پژوهشگران در ارزیابی کیفی میوه‌ها بوده است. در پژوهشی گزارش شد که افزایش در نسبت TSS/TA به دلیل کاهش در میزان اسیدیته قابل تیتر و ثابت بودن میزان TSS است (۲۷). در این پژوهش نیز مشاهده شد که افزایش این نسبت بیشتر به دلیل کاهش TA در طول رسیدن میوه بوده است (گرچه اختلاف معنی‌داری از نظر آماری بین تیمارها وجود نداشت). همچنین نسبت دو شاخص TSS به TA معمولا به عنوان شاخص بلوغ در نظر گرفته شده و با توجه به شرایط آب و هوایی، مقدار آن در هنگام رسیدن میوه در هر منطقه تعیین می‌شود. روند کاهشی ویتامین ث با رسیدن، در برخی میوه‌ها نیز گزارش شده است. برای مثال در ازگیل حداکثر اسکوربیک اسید در اولین مرحله نمو ثبت شد و کمترین آن در مرحله قبل از رسیدن بود. محتوای اسکوربیک اسید با بزرگ شدن میوه کاهش یافت. این حالت در میوه‌هایی چون خرمالو و گیلاس نیز مشاهده شده است. به نظر می‌رسد در طی رسیدن میوه، هورمون اتیلن که نسخه‌برداری از ژن‌های سنتزکننده آنزیم‌های مختلف را در جهت کاهش ترکیب‌های گیاهی تأثیرگذار در فرایند رسیدگی فعال می‌کند، افزایش می‌یابد. با بالارفتن سرعت متابولیسم طی رسیدن، تعداد رادیکال‌های آزاد تولید شده افزایش یافته و آنتی‌اکسیدان هایی مانند اسکوربیک اسید در جهت حفاظت از اثرات سمی رادیکال‌های

آزاد و کاهش مواد مضر مصرف شده و مقدار آن کاهش می‌یابد (۲۹).

میزان اسانس و محتوی کلروفیل موجود در بخش فلاودو

نتایج تجزیه واریانس مرحله بلوغ میوه اترج صغیر بر میزان اسانس، عملکرد اسانس و محتوی کلروفیل (آ، ب و کل) معنی‌دار شد (جدول ۷). نتایج مقایسه میانگین تاثیر تیمارها بر درصد و عملکرد اسانس در شکل ۴ آورده شده است. بیشترین میزان اسانس (۲/۳۷ درصد حجمی-وزنی) در مرحله تغییر رنگ اندازه‌گیری شد و با پیشرفت بلوغ میزان اسانس کاهش یافت (۱/۶۴ درصد) گرچه بین سایر مراحل بلوغ اختلاف معنی‌داری از نظر آماری وجود نداشت (شکل ۴-a). از طرف دیگر، کمترین عملکرد اسانس (۰/۱۵ میلی‌لیتر در میوه) مربوط به میوه رسیده زرد بود در حالی که سایر تیمارها در یک گروه قرار داشتند (شکل ۴-b). مطابق نتایج مندرج در شکل ۴-c، طی بلوغ میوه، محتوای کلروفیل (آ، ب و کل) کاهش معنی‌داری داشت. بالاترین میزان کلروفیل آ (۲/۷۵ میلی‌گرم در گرم نمونه خشک) در مرحله ابتدای بلوغ و کمترین میزان در مرحله بسیار رسیده اندازه‌گیری شد. بین مراحل رسیده زرد و بسیار رسیده اختلاف معنی‌داری از این نظر وجود نداشت. کلروفیل ب و کلروفیل کل نیز روند نزولی یکسانی را طی نمودند. از نظر کلروفیل کل اختلاف معنی‌داری بین مرحله سوم و چهارم بلوغ وجود نداشت. بیشترین میزان اسانس (۶/۹ درصد) در نارنگی خاسی (Khasi) از کشور هند، در مرحله تغییر رنگ اندازه‌گیری شد در حالی‌که کمترین میزان (۵ درصد) در مرحله کاملا رسیده اندازه‌گیری شد (۳) که با نتایج این تحقیق مطابقت دارد. پژوهشی در کشور چین در رابطه با تغییرات کمی و کیفی اسانس واریته‌ای از اترج (واریته سارکوداکتیلیس Sarcodactylis) انجام گرفت. در این تحقیق تغییرات اسانس در سه مرحله بلوغ (نابالغ، تغییر رنگ و میوه بالغ) بررسی شد. نتایج نشان داد که طی رسیدن میزان اسانس افزایش می‌یابد (۳۸). در تحقیق دیگری در کشور تونس در رابطه با تغییرات اسانس ۴ گونه مرکبات در ۳ مرحله بلوغ (سبز رسیده، نیمه رسیده و رسیده) مشخص گردید که در میوه نارنج طی فرآیند بلوغ میزان اسانس ابتدا کاهش و سپس افزایش چشمگیری داشت. بطوری‌که بیشترین میزان اسانس مربوط به مرحله رسیده و کمترین میزان مربوط به مرحله نیمه رسیده بود. ولی در رابطه با لیمو، بیشترین میزان اسانس در مرحله سبز رسیده اندازه گیری شد و با پیشرفت بلوغ میزان اسانس کاهش یافت. درحالیکه در دو گونه دیگر مرکبات، پرتقال مالتایز و نارنگی، بیشترین میزان اسانس در مرحله نیمه رسیده اندازه گیری شد (۵). این تغییرات شدید رفتاری را می توان به ساختار ژنتیکی متفاوت گونه‌های مرکبات، شرایط اقلیمی منطقه کشت، تغییرات آب و هوایی در زمان برداشت مانند میانگین دما و بارش فصلی، نوع نمونه (تر یا خشک) و روش استخراج مرتبط دانست (۳، ۱۹ و ۳۸).

جدول ۷- تجزیه واریانس تاثیر مرحله رسیدن میوه بر برخی مواد موثره و اجزای فلاونوئیدهای میوه اترج صغیر (*C. medica* var. medica)

Table 7- ANOVA for the effect of maturity stage on some active substances and flavonoids constituents of citron fruit *C. medica* var. medica

منبع تغییرات S.O.V	درجه آزادی df	درصد اسانس Essential oil percentage	عملکرد اسانس Essential oil yield	کلروفیل آ Chlorophyll a	کلروفیل ب Chlorophyll b	کلروفیل کل Total chlorophyll
بلوک Block	3	0.015	0.0001	0.077	0.166	0.453
مرحله بلوغ Maturity stage	3	0.339**	0.002*	4.14**	2.71**	13.3**
منبع تغییرات S.O.V	**درجه آزادی df**	**روتین Rutin**	**ترانس فرولیک اسید Trans ferulic acid**	**هسپریدین Hesperidin**	**هسپرتین Hesperetin**	**کوئرستین Quercetin**
بلوک Block	2	0.001	0.001	0.008	0.001	0.005
مرحله بلوغ Maturity stage	2	**0.034	0.004**	0.735**	0.047**	0.414**

*و **:ns به ترتیب معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد و ۱ درصد.

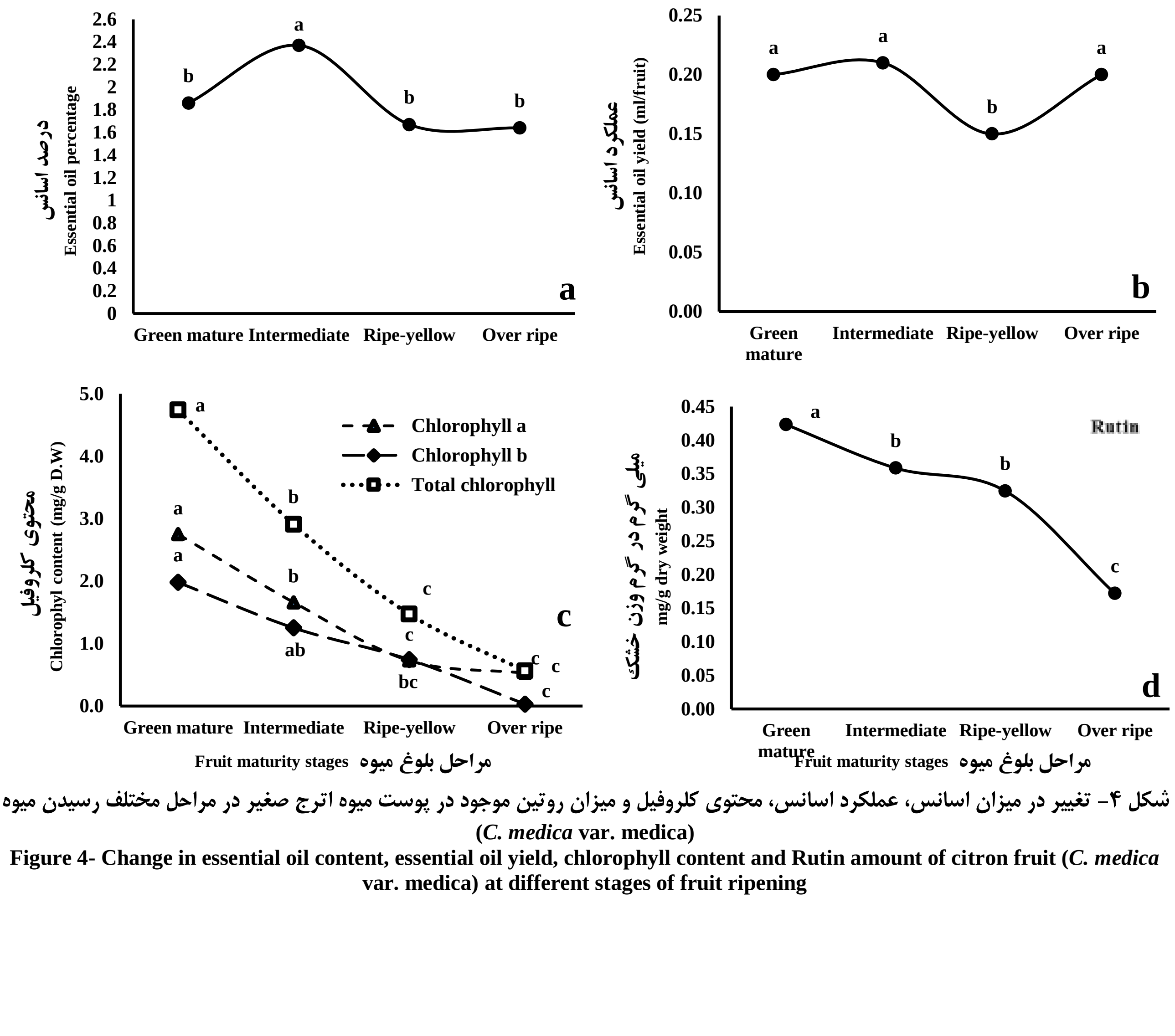
* and **: Significant at 5% and 1% of probability levels , respectively.

همزمان با بلوغ میوه مرکبات، رنگ پوست به دلیل اختلاف دمای شب و روز و به دنبال آن کاهش کلروفیل و افزایش غلظت کاروتنوئید

تغییر رنگ می‌دهد. کاروتنوئیدهای متنوعی مسئول ایجاد رنگ در گونه‌های مرکبات هستند و فراهم شدن شرایط دمایی مناسب سبب افزایش بیان ژن‌های مربوط به سنتز کاروتنوئیدهای کلیدی در پوست شده است (۶). در حالت عادی در داخل کلروپلاست، آنزیم کلروفیلاز با غشاء درونی پیوند داشته و به سوبسترای اصلی خود که با تیلاکوئیدها پیوند شده، دسترسی ندارد، ولی در طی فرآیند بلوغ و پیری میوه یا برگ، انسجام کلروپلاست از بین رفته و این دو ترکیب در تماس مستقیم با هم قرار گرفته که در نهایت منجر به تجزیه کلروفیل می‌شود (۳۵). تجزیه کلروفیل و تبدیل شدن آن به فئوفیتین و فئوفورباید منجر به تغییر رنگ میوه‌ها و سبزی‌ها از سبز به سبز روشن و در نهایت زرد، قرمز یا بنفش می‌شود (۲۰). از دست دادن رنگ زمینه با مجموعه فعالیت‌های بیوشیمیایی میوه در زمان رسیدن نظیر میزان تنفس، تولید اتیلن و تجزیه پروتئین‌ها در ارتباط است (۳۰).

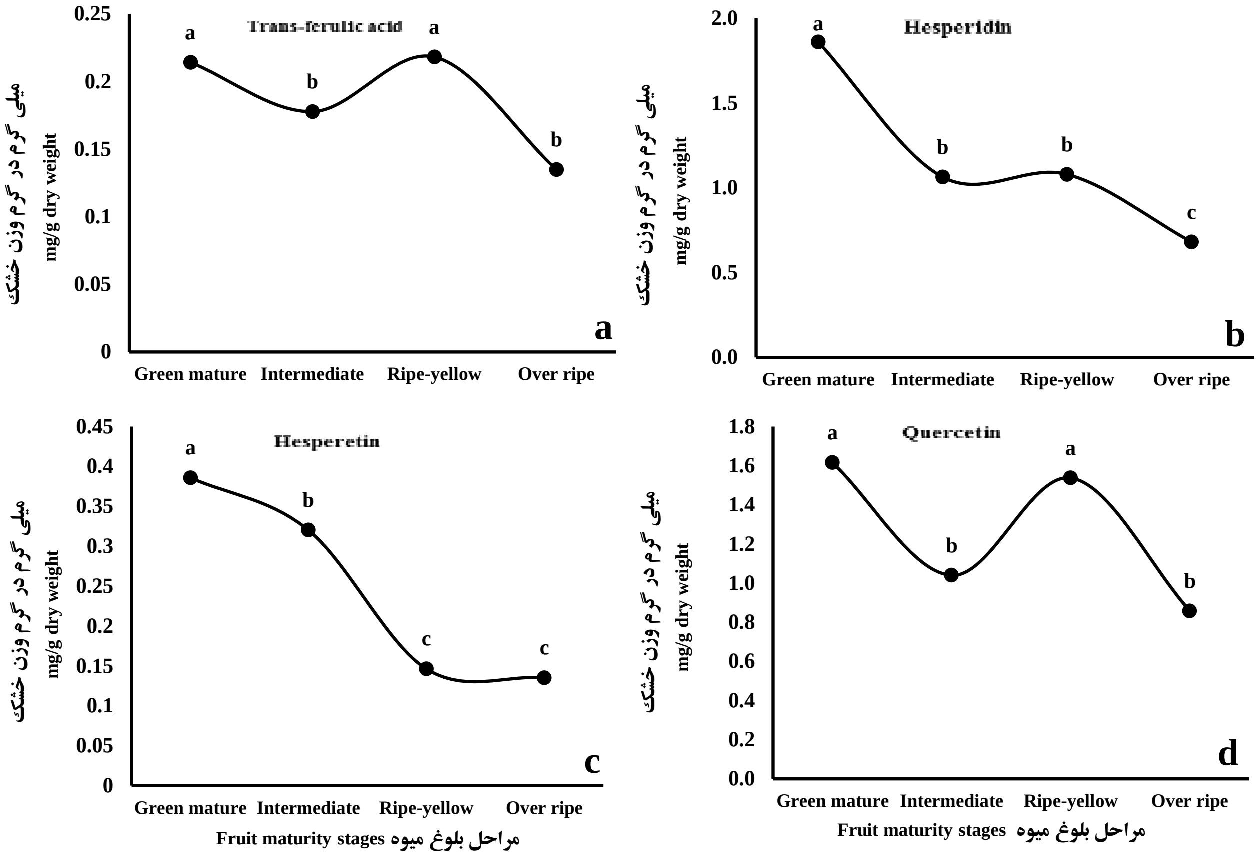
پلی فنول‌های موجود در پوست فلاودو اترج صغیر

نتایج آنالیز واریانس نشان داد که مرحله بلوغ میوه اترج صغیر بر میزان پلی‌فنل‌های موجود در فلاودو پوست (روتین، ترانس-فرولیک اسید، هسپریدین، هسپرتین و کوئرستین) تاثیر معنی‌داری دارد (جدول ۷). نتایج مقایسه میانگین نشان داد که میزان روتین تحت تأثیر مرحله رسیدن قرار گرفته است به‌طوری که بیشترین میزان در مرحله سبز رسیده اندازه‌گیری شد (۰/۴۲۳ میلی‌گرم بر گرم ماده خشک) و با پیشرفت بلوغ مقدار روتین کاهش یافت به طوری که کمترین میزان (۰/۱۷۲ میلی‌گرم بر گرم) در مرحله بسیار رسیده مشاهده گردید (شکل ۴-d). بیشترین میزان ترانس فرولیک اسید (۰/۲۱۸ میلی‌گرم بر گرم ماده خشک) در مرحله سوم رسیدن (زرد رسیده) اندازه‌گیری شد که اختلاف معنی‌داری با میوه رسیده سبز نداشت و کمترین میزان آن در مرحله بسیار رسیده (۰/۱۳۵ میلی‌گرم بر گرم ماده خشک) اندازه‌گیری شد (شکل ۵-a). بیشترین میزان هسپریدین (۱/۸۶۰ میلی‌گرم بر گرم ماده خشک) مربوط به مرحله سبز رسیده بود و با پیشرفت بلوغ میزان آن کاهش یافت بطوریکه کمترین میزان (۰/۶۸۰ میلی‌گرم بر گرم ماده خشک) در مرحله بسیار رسیده اندازه‌گیری شد. تغییرات این ترکیب در مرحله تغییر رنگ و رسیده زرد اختلاف معنی‌داری با یکدیگر نداشتند (شکل ۵-b).



شکل ۴- تغییر در میزان اسانس، عملکرد اسانس، محتوی کلروفیل و میزان روتین موجود در پوست میوه اترج صغیر در مراحل مختلف رسیدن میوه (*C. medica* var. medica)

Figure 4- Change in essential oil content, essential oil yield, chlorophyll content and Rutin amount of citron fruit (*C. medica* var. medica) at different stages of fruit ripening



شکل ۵- تاثیر مرحله بلوغ میوه بر میزان پلی‌فنل‌های موجود در بخش فلاودو پوست میوه اترج صغیر (*C. medica* var. medica)

Figure 5- The effect of fruit maturity on polyphenol constituents of citron fruit (*C. medica* var. medica)

میزان هسپرتین به شدت تحت تأثیر مرحله رسیدن قرار گرفته است به‌طوری که بیشترین میزان هسپرتین (۰/۳۸۶ میلی‌گرم بر گرم ماده خشک) مربوط به مرحله سبز رسیده بود و با پیشرفت بلوغ میزان آن کاهش یافت به‌طوری که کمترین میزان (۰/۱۳۵ میلی‌گرم بر گرم ماده خشک) در مرحله بسیار رسیده اندازه‌گیری شد (شکل ۵-c). نتایج نشان داد که بیشترین میزان کوئرستین (۱/۶۱۵ میلی‌گرم بر گرم ماده خشک) در مرحله رسیده سبز بود و با پیشرفت بلوغ میزان آن کاهش یافت. ولی از مرحله دوم رسیدن (تغییر رنگ) به مرحله مرحله سوم (زرد رسیده) مقدار آن افزایش یافت (۱/۵۳۸ میلی‌گرم بر گرم ماده خشک) و مجددا در مرحله چهارم میزان کوئرستین کاهش یافت به‌طوری که کمترین میزان آن در مرحله بسیار رسیده (۰/۸۵۸ میلی‌گرم بر گرم ماده خشک) اندازه‌گیری شد (شکل ۵-d). در مرکبات حدود ۶۰ نوع ترکیب از گروه فلاونوئیدها شناسایی شده‌اند. ترکیباتی چون نارنجین، هسپریدین، نئوهسپریدین، کوئرستین و برخی آنتوسیانین‌ها (موجود در پرتقال‌های خونی) از مهم‌ترین فلاونوئیدهای موجود در مرکبات هستند (۳۳). یو و همکاران (۴۱) بر روی فلاونوئیدهای موجود در پوست و عصاره گریپ‌فروت تحقیق کردند و نتایج آنها نشان داد که روتین در پوست میوه وجود ندارد اما در عصاره میوه به میزان ۰/۰۳۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر روتین وجود داشت. در پژوهشی دیگر، در پوست میوه لایم در هیچ یک از مراحل برداشت (۳۰، ۵۰، ۷۰ و ۹۰ روز پس از تشکیل میوه) ترکیب روتین شناسایی نگردید. همچنین بیشترین میزان فلاونوئید هسپریدین در پوست میوه لایم (۳/۲۳ درصد وزن خشک) در ۳۰ روز بعد از تشکیل میوه و کمترین میزان آن (۰/۲۷ درصد وزن خشک) مربوط به ۹۰ روز پس از تشکیل میوه بود. به‌طوری که با گذشت روزهای پس از گلدهی میزان آن شدیدا کاهش یافت (۱۶). طبق بررسی‌های انجام شده غلظت فلاوونوئید در مرکبات به سن گیاه بستگی دارد. بافت‌های گیاهی تحت تقسیم سلولی دائمی (بافت‌های جوان‌تر) دارای بالاترین سطح فلاوونوئیدها هستند (۳۲). دل-ریو و همکاران (۷) نیز در بررسی‌های خود که بر روی فلاونوئیدهای موجود در میوه دو رقم لمون در مراحل مختلف رشد انجام دادند، گزارش کردند که بیشترین میزان فلاونوئید هسپریدین (۳۹/۶ درصد وزن خشک)، در مرحله ۳۰ روز پس از

تشـکیل میوه و کمترین میزان هسـپریدین (۰/۸۱ درصد وزن خشک) در ۱۵۰ روز پس از تشـکیل میوه یافت شد. وانگ و همکاران (۳۶) در تحقیقی که بر روی مرکبات کاشــته شــده در تایوان انجام دادند، مشـخص کردند که ترکیبات غالب در مرکبات، هسـپریدین، نارنجین، کامفرول و دیوســمین می باشــند. همانطور که مشـاهده گردید نتایج تحقیق حاضــر با نتایج بســیاری از پژوهشــگران در رابطه با ســایر گونه‌های مرکبات تطابق داشـت و با پیشرفت بلوغ غلظت فلاونوئیدها کاهش یافت. ممکن است افزایش میزان فلاونوئید کل در این تحقیق بـه دلیل افزایش کارتنوئیدها (که خود زیرمجموعه‌ای از فلاونوئیدهای رنگی می‌باشند) و سایر فلاونوئیدها باشد.

نتیجه‌گیری

اترج صغیر یکی از گونه‌های مرکبات می‌باشد که در جنوب استان فارس کشت می‌گردد و علاوه بر استفاده از آب‌میوه این گونه از پوست میوه آن جهت اسـانس‌گیری (به دلیل عطر مطبوع آن کاربرد وسـیعی در صــنایع شــیرینی‌پزی به ویژه شــیرینی‌های خامه‌ای) و عرق‌گیری جهت کاربردهای دارویی و غذایی اســتفاده می‌شــود. انتخاب بهترین بخش گیاهی و مناســب‌ترین زمان برداشـت نقش بسـزایی در حصول حداکثر ماده موثره این گیاه (اسانس و فلاونوئیدها به عنوان مهم‌ترین متابولیت ثانویه) دارد. به طور کلی نمونه‌های پوست بیرونی (فلاودو) و ســپیدبر (آلبیدو) در بیشــتر صــفات مهم دارویی دارای غلظت بالایی بودند و مراحل ابتدایی بلوغ (رسیده سبز و مرحله تغییر رنگ) به عنوان بهترین مراحل جهت دستیابی به حداکثر ترکیبات دارویی مهم در این گونه شـناخته شـد. همچنین پیشـنهاد می‌گردد تجزیه اسـانس جهت تعیین کیفیت ترکیبات آن نیز در تحقیقات آینده مورد توجه قرار گیرد.

منابع

1- Ahankoub Ro M., Foutohi Ghazvini R., and Fattahi Moghadam J. 2014. Investigation biochemical diversity of peel and pulp from some natural citrus biotypes. Journal of Plant Production Research 21(4): 81-98. (In Persian with English abstract)
2- Bhuiyan M.N.I., Begum J., Sardar P.K., and Rahman MS. 2009. Constituents of peel and leaf essential oils of *Citrus medica* L. Journal of Scientific Research 1: 387-392.
3- Bhuyan N., Barua P.C., Kalita P., and Saikia A. 2015. Physico-chemical variation in peel oils of Khasi mandarin (*Citrus reticulata* Blanco) during ripening. Indian Journal of Plant Physiology 20: 227-231.
4- Boudries H., Madani, K., Touati, N., Samiha S., Medouni S., and Chibane M. 2012. Pulp antioxidant activities, mineral contents and juice nutritional properties of Algerian clementine cultivars and mandarin. African Journal of Biotechnology 11(18): 4258-4267.
5- Bourgou S., Rahali F.Z., Ourghemmi I., and Saidani Tounsi M. 2012. Changes of peel essential oil composition of four Tunisian citrus during fruit maturation. The Scientific World Journal 2012: 1-10.
6- Carmona L., Zacarias L., and Rodrigo M.J. 2012. Stimulation of coloration and carotenoid biosynthesis during postharvest storage of Navelina orange fruit at 12°C. Postharvest Biology and Technology 74: 108-117.
7- Del Río J.A., Fuster M.D., Gomez P., Porras I., García-Lidon A., and Ortuno A. 2004. Citrus lemon: a source of flavonoids of pharmaceutical interest. Food Chemistry 84: 457–461.
8- Dere S., Gunes T., and Sivaci R. 1998. Spectrophotometric determination of chlorophyll a, b and total carotenoid contents of some algae species using different solvents. Journal of Botany 22: 13- 17.
9- Dong X., Hu Y., Li Y., and Zhou Zh. 2019. The maturity degree, phenolic compounds and antioxidant activity of Eureka lemon [*Citrus lemon* (L.) Burm. f.]: A negative correlation between total phenolic content, antioxidant capacity and soluble solid content. Scientia Horticulturae 243: 281-289.
10- Ebrahimzadeh M.A., Hosseinimehr S.J., Mahmoudi M., Ghayekhloo M.R., and Hosseini M. 2005. Measuring the amount of vitamin c in citrus fruits by a two step oxidation-reduction titration method. Journal of Mazandaran University of Medical Sciences 48: 26-32. (In Persian with English abstract)
11- Fatahi Moghadam J., Seyed Ghasemi S. E., and Najafi K. 2018. Evaluation of fruit physico-chemical characteristics of new Mandarins Noushin (*Citrus reticulata* cv. Noushin) and Shahin (Citrus reticulata cv. Shahin) during different harvesting times. The Plant Production (Scientific Journal of Agriculture) 40(4): 77-90. (In Persian with English abstract)
12- Fatahi Moghadam J., Seyedghasemi S.E., and Madani S. 2017. The effect of five rootstocks on physical, mechanical and chemical characteristics of Yashar fruits -a new Mandarin- during ripening stages. Journal of Plant Production (Journal of Agricultural Sciences and Natural Resources) 24(2): 109-123. (In Persian with English abstract)
13- Fattahi J., Hamidoghli Y., Fotouhi R., Ghaseminejad M., and Bakhshi D. 2011. Assessment of fruit quality and antioxidant activity of three citrus species during ripening. South Western Journal of Horticulture, Biology and Environment 2: 113-128.
14- Fattahi J., Hamidoghli Y., Fotouhi R., Ghasemnejad M., and Bakhshi D. 2011. Evaluation of physicochemical properties and antioxidant activity of the peel of different commercial citrus species. Journal of Horticultural Science 25(2): 211-217. (In Persian with English abstract)

15- Fotouhi Ghazvini R., and Fattahi Moghadam J. 2010. Citrus cultivation in Iran. Gilan: Gilan University Press.
16- Ghasemi SH., Hemati K., Bashiri Sadr Z., Ghasem Nezhad A., and Ghasemi M. 2011. Quantitation of phenolic compounds in tissues of lime (*Citrus aurantifolia*) fruit during growth and maturation. Journal of Food Science and Technology 31(8): 69-75. (In Persian with English abstract)
17- Habibi, F., and Ramezanian A. 2017. Changes in Physicochemical and Bioactive Compounds of Blood Orange Fruit 'Sanguine' during Ripening. Iranian Journal of Horticultural Science and Technology 18 (4): 365-376. (In Persian with English abstract)
18- Hemati K.H., and Omidbaigi R. 2003. Investigation of the naringin flavonoid content during different fruit development of marsh grapefruit (*Citrus paradisii* Macf.). Journal of Agricultural Science 10(2): 65-72. (In Persian with English abstract)
19- Hosni K., Zahed N., Chrif R., Abid I., Medfei W., Kallel M., Ben Brahim N., and Sebei H. 2010. Composition of peel essential oils from four selected Tunisian citrus species: Evidence for the genotypic influence. Food Chemistry 123: 1098-1104.
20- Koca N., Karadeniz F., and Burdulu H.S. 2006. Effect of pH on chlorophyll degradation and colour loss blanched green peas. Journal Food Chemistry 100: 609- 615.
21- Kumar, S., Narayan Jena S., and Nair N.K. 2010. ISSR polymorphism in Indian wild orange (*Citrus indica* Tanaka, Rutaceae) and related wild species in North-East India. Scientia Horticulturae 123: 350-359.
22- Menichini F., Tundis R., Bonesi M., Loizzo M.R., Conforti F., Statti G., Di Cindi B., Houghton P.J., and Menichini F. 2009. The influence of fruit ripening on the phytochemical content and biological activity of *Capsicum chinense* Jacq. Habanero. Food Chemistry 114: 553-560.
23- Menchini F., and Tundis R. 2011. Phytochemichal profile, antioxidant, anti-inflammatory and hypoglycemic potential of hydroalcoholic extracts from *Citrus medica* L. cv. Diamante flowers, leaves and fruits at two maturity stages. Food and Chemical Toxicology 49: 1549-55.
24- Mirheydar H. 2012. Fruits. Herbal education 2, Ninth ed, Islamic culture publishing office, Tehran, Iran.
25- Mišan A., Mimica-Dukić N., Mandić A., Sakač M., Milovanović I., and Sedej I. 2011. Development of a rapid resolution HPLC method for the separation and determination of 17 phenolic compounds in crude plant extracts. Open Chemistry 9(1): 133-142.
26- Oke F., Aslim B., Ozturk S., and Altundag S. 2009. Essential oil composition, antimicrobial and antioxidant activities of Satureja cuneifolia ten. Food Chemistry 112: 874-879.
27- Pailly O., Tison G., and Amourouxb A. 2004. Harvest time and storage conditions of Star Ruby grapefruit (Citrus paradisi Macf.) for short distance summer consumption. Postharvest Biology and Technology 34: 65-73.
28- Popova M., Bankova V., Butovska D., Petkov V., Nikolova-Damyanova B., Sabatini A.G., Marcazzan G.L., and Bogdanov S. 2004. Validated methods for the quantification of biologically active constituents of poplar-type propolis. Phytochemistry Analysis 15: 235-240.
29- Rekha C., Poornima G., Manasa M., Abhipsa V., Pavithra Devi J., Vijay Kumar H.T., and Prashith Kekuda T.R. 2012. Ascorbic acid, total phenol content and antioxidant activity of fresh juices of four ripe and unripe citrus fruits. Chemical Science Transactions 1: 303-310.
30- Serrano M., Martinez-Romero D., Guillen F., Castillo S., and Valero D. 2006. Maintenance of broccoli quality and functional properties during cold storage as effected by modified atmosphere packaging. Postharvest Biology and Technology 39: 61-68.
31- Seyedghasemi S.E., Fattahi Moghadam J., and Babakhani B. 2018. Investigation of bioactive compounds changes of two Lisbon (*Citrus limon* cv. Lisbon) and Cook eureka lemon (C. limon cv. Cook Eureka) varieties during ripening. Journal of Plant Research (Iranian Journal of Biology) 31(1): 182-193. (In Persian with English abstract)
32- Sharma K., Mahato N., and Lee Y.R. 2018. Extraction, characterization and biological activity of citrus flavonoids. Reviews in Chemical Engineering 35(2): 1-20.
33- Tripoli E., Guardia M.L., Giammanco S., Majo D.D., and Giammanco M. 2007. Citrus flavonoids: Molecular structure, biological activity and nutritional properties: A Review. Food Chemistry 104: 466-479.
34- Venturini N., Barboni T., Curk F., Costa J., and Paolini J. 2014. Volatile and flavonoid composition of the peel of *Citrus medica* L. var. Corsican fruit for quality assessment of its liqueur. Food Technology and Biotecnology 52: 403-410.
35- Wang H.C., Huang X.M., Hu G.B., Yang Z.Y., and Huang H.B. 2005. A comparative study of chlorophyll loss and its related mechanism during fruit maturation in the pericarp of fast and slow-degreening Litchi pericarp. Scientia Horticulturae 106: 247- 257.
36- Wang Y.C., Chuang Y.C., and Ku Y.H. 2007. Quantitation of bioactive compounds in citrus fruits cultivated in Taiwan. Food Chemistry 102: 1163-1171.
37- Wojdylo A., Oszmianski J., and Czemerys R. 2007. Antioxidant activity and phenolic compound in 32 selected herbs. Food Chemistry 1005: 940-949.
38- Wu Z., Li H., Yang Y., Zhan Y., and Dawei T. 2013. Variation in the components and antioxidant activity of *Citrus medica* L. var. sarcodactylis essential oils at different stages of maturity. Industrial Crops and Products 46: 311-316.

39- Xu G., Ye X., Liu D., Ma Y., and Chen J. 2008. Composition and distribution of phenolic acids in Ponkan (*Citrus poonensis* Hort. ex Tanaka) and Huyou (*Citrus paradisi* Macf. Changshanhuyou) during maturity. Journal of Food Composition and Analysis 21: 382-389.

40- Yoo K.M., Lee K.W., Park J.B., Lee H.J., and Hwang I.K. 2004. Vareation in major antioxidants and total antioxidant activity of Yuzu (*Citrus junos* ex Tanala) during maturation and between cultivars. Agricultural and Food Chemistry 52: 5907-5913.

41- Yu J., Deepak V., Dandekar A., Romeo T., Toledo B., Rakesh K., Singh B., Bhimanagouda K., and Patil S. 2007. Supercritical fluid extraction of limonoids and naringin from grapefruit (*Citrus paradisi* Macf.) seeds. Food Chemistry 105: 1026-1031.

Journal of Horticultural Science
Vol. 35, No.3, Fall 2021, P. 427-446
ISSN: 2008 - 4730

نشریه علوم باغبانی (علوم و صنایع کشاورزی)
جلد ۳۵، شماره ۳، پاییز ۱۴۰۰، ص. ۴۴۶-۴۲۷
شاپا: ۴۷۳۰ - ۲۰۰۸

The Effect of Fruit Maturity on Physicochemical Properties and Polyphenols in Citron Fruit (*Citrus medica* var. medica Proper.)

N. Taghvaeefard[1]- A. Ghani[2]*- M. Hosseinifarahi[3,4]
Received: 05-09-2020
Accepted: 07-12-2020

Introduction: The harvest time and type of plant part have important roles in obtaining maximum amounts of active substances from medicinal plants. Medicinal plants vary in terms of phenological stages and maturity and each medicinal plant can be evaluated separately in research. Determining the exact time of harvest and selecting a plant organ for maximum yield of secondary metabolites can be very important and economically effective. Othroj-Saghir (*Citrus medica* var. medica Proper) or Othroje-Kabir (*Citrus medica* var. macrocarpa) is one of the most important citrus species. The southern provinces of Iran, especially the southern cities of Fars province, are the largest areas in which this species is cultivated. In addition to fruit juice, other parts of the fruit especially the flavedo, can be used for medicinal purposes and in food industries. In this study, for the first time, some physical and biochemical changes of different parts of Citrus medica var medica fruits were evaluated during fruit ripening. Also, some active substances (i.e. essential oil content, flavonoid components, etc.) of the flavedo were measured as the most important medicinal parts of the fruit through different stages of ripening.

Materials and Methods: In this study, the effects of fruit ripening on the biochemical properties of different parts of Citron fruit were evaluated. A factorial experiment was set up according to a randomized complete block design (RCBD) with two factors and four replications. The first factor included four levels: different stages of fruit maturity (green mature, intermediate, yellow ripe and over ripe stage). The second factor had four levels: the different parts of the Citron fruit (i.e. outer skin or flavedo, inner skin or albedo, pulp and juice). The most important measured traits were flavon and flavonols, total flavonoids, total phenolic compounds and antioxidant activity. Physical changes in different parts of the fruit (fresh and dry weight of flavedo and albedo, fresh weight of fruit, fruit diameter and height of fruit, etc.) were measured.

Assessments also carried out to identify several features of fruit juice such as acidity, total soluble solids (TSS), titrable acidity (TA) and vitamin C during fruit ripening. Chemical measurements were aimed at determining the most important phytochemical compounds of the flavedo section during fruit ripening. These features included the essential oil percentage and yield, chlorophyll content and polyphenols constituents (rutin, trans-ferulic acid, hesperidin, hesperetin and quercetin by HPLC).

Results and Discussion: The results showed that the fruit maturity stage significantly affected most of the studied traits. The highest amounts of flavon and flavonols (0.377 mg quercetin/g dry weight) and total flavonoids (16.38 mg quercetin/g dry weight) were measured in the flavedo at the over ripe stage. The antioxidant activity initially increased during fruit ripening, but it decreased slightly (75.0%) from the yellow stage to the over ripe stage. The lowest rate of antioxidant activity (53.6%) was observed in the green stage and the highest rate (78.4%) was measured in the yellow ripe stage. The highest amounts of antioxidant activity (83.3% and 73.8%) were measured in the albedo and flavedo samples, respectively, and the lowest amount (54.1%) was recorded in the pulp section. The highest amount of flavedo essential oil (2.37%v/w) was measured in intermediate stage. The chlorophyll content with maturity progress was decreased. Progress in fruit maturity was reduced the most components of polyphenols. The maximum amount of hesperidin, as an important phenolic component, was identified in the peel of Citron fruit (1.86 mg/g dry weight) at the green mature stage. Its amount decreased through the stages of maturity, so that the lowest amount (0.68 mg/g dry weight) was measured at the over ripe stage.

Conclusion: In general, the stage of maturity and plant part had important effects on the amount of biochemical traits. The flavedo part of Citron fruit showed superior medicinal properties. Different active substances react variedly during maturity and so the preferable composition should be harvested according to the desired conditions.

---

1 and 3- Ph.D Student and Assosiate Professor, Department of Horticultural Science, Yasooj Branch, Islamic Azad University, Yasooj, Iran, respectively.
2- Assitant Professor, Department of Horticultural Science, Faculty of Agriculture, Jahrom Universtiy, Jahrom, Iran
(*- Corresponding Author Email: askar.ghani11@yahoo.com)
4- Sustainable Agriculture and Food Security Research Group, Yasooj Branch, Islamic Azad University, Yasooj, Iran
DOI: 10.22067/jhs.2020.61947.0

The best stages to reach maximum essential oil percentage and polyphenol components are the early stages of maturity (i.e. green mature and intermediate stages).

Keywords: Antioxidant activity, *Citrus medica* var. medica Proper., Essential oil, Flavedo, Hesperidin